

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in
Agricoltura

Centro di Ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia

Laboratorio di Criobiologia e Crioconservazione

DOTTORATO INTERNAZIONALE DI RICERCA

"INSECT SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY"

XXV CICLO

TESI DI DOTTORATO

**Stoccaggio di uova ospiti a basse e
ultrabasse temperature e studi preliminari
sulla crioconservazione degli Imenotteri
ooparassitoidi**

Coordinatore

Clar.mo Prof.

Francesco PENNACCHIO

Candidato

Agostino Strangi

Relatore

Clar. mo Prof.

Pio Federico ROVERSI

Co-Relatori

Dott. Maurizio Lambardi

Dott. Giuseppino Sabbatini Peverieri

Dott. Sauro Simoni

Anno accademico 2012-2013

Indice

PREMESSA	4
INTRODUZIONE	6
Contesto Generale	6
Basse temperature e organismi viventi	10
Stoccaggio a lungo termine di insetti.....	15
MATERIALI E METODI.....	26
Origine della popolazione di <i>Leptoglossus occidentalis</i> e allevamento	26
Introduzione dal Nord America, caratterizzazione molecolare e allevamento di <i>Gryon pennsylvanicum</i>	27
Influenza della temperatura e del tempo di stoccaggio delle uova di <i>Leptoglossus occidentalis</i> sulla parassitizzazione e sullo sviluppo di <i>G. pennsylvanicum</i>	29
Influenza della temperatura di stoccaggio delle uova di <i>Leptoglossus occidentalis</i> sulla fitness di adulti F1 di <i>Gryon pennsylvanicum</i>	30
Morfologia e struttura del corion delle uova di <i>Leptoglossus occidentalis</i>	31
Test di permeabilità delle uova di <i>Leptoglossus occidentalis</i>	32
Origine della colonia ed allevamento di <i>Galleria mellonella</i>	35
Origine ed allevamento del ceppo di <i>Trichogramma brassicae</i>	35
Decorionizzazione delle uova di <i>Galleria mellonella</i> parassitizzate da <i>Trichogramma brassicae</i>	36
Caricamento dei crioprotettivi nelle uova parassitizzate di <i>Galleria mellonella</i>	37
ANALISI DEI DATI E PROCEDURE STATISTICHE ADOTTATE.....	39
RISULTATI	40
Influenza della temperatura e del tempo di stoccaggio delle uova di <i>Leptoglossus occidentalis</i> su parassitizzazione e sviluppo di <i>G. pennsylvanicum</i>	40
Influenza della temperatura di stoccaggio delle uova ospiti sulla fitness della discendenza di adulti di <i>Gryon pennsylvanicum</i> ottenuti da uova stoccate a temperature basse e ultrabasse	48
Morfologia e struttura del corion delle uova di <i>Leptoglossus occidentalis</i>	50

Permeabilità delle uova di <i>L. occidentalis</i>	54
Decorionizzazione delle uova di <i>Galleria mellonella</i> parassitizzate da <i>Trichogramma brassicae</i>	59
Introduzione dei crioprotettivi nelle uova parassitizzate di <i>Galleria mellonella</i>	63
CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	65
RINGRAZIAMENTI	69
BIBLIOGRAFIA	70

PREMESSA

Artropodi e Nematodi comprendono una quota preponderante del numero di specie animali del nostro pianeta e gli studi svolti nell'ambito del Dottorato si inseriscono in un quadro generale di ricerche sulla crioconservazione, avviate a partire dal 2005 presso il Centro di Ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia di Firenze del CRA, mirate alla definizione di materiali e procedure di permeabilizzazione specie-specifiche e all'identificazione degli stadi ottimali per trattamenti di vitrificazione di organismi inclusi in questi due Phyla, con il fine ultimo di realizzare le condizioni per la creazione di "banche genetiche crioconservate", nelle quali stoccare a lungo termine specie di interesse agroforestale e ambientale (Irdani et al. 2006; Cosi et al. 2008; Irdani et al. 2011; Roversi et al. 2013).

Le indagini di cui si riferisce hanno riguardato 2 sistemi modello:

1. Fitofago ospite: *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera Coreidae)
 - Ooparassitoide: *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead) (Hymenoptera Platygasteridae)
2. Fitofago ospite: *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera Pyralidae)
 - Ooparassitoide: *Trichogramma brassicae* (Bezdenko) (Hymenoptera Trichogrammatidae).

Nel primo sistema, dopo la caratterizzazione molecolare del ceppo di *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead), introdotto in Europa dal Canada nell'ambito di un programma di "lotta biologica classica" (Roversi et al. 2011), con riferimento alle due problematiche sopracitate, sono state valutate sia le potenzialità di stoccaggio delle uova di *Leptoglossus occidentalis* per il successivo utilizzo per la parassitizzazione da parte

del Platigastride che le possibilità di permeabilizzazione del corion delle uova del Coreide, quale primo passo per la messa a punto di un protocollo di crioconservazione per uova di ospiti contenenti embrioni di Imenotteri endoparassitoidi, attualmente non disponibile per nessuna specie di questo gruppo. Lo studio sulla permeabilizzazione è stato realizzato per acquisire informazioni di base sulle possibilità di introdurre crioprotettivi attraverso il corion di Eterotteri, caratterizzato da una ultrastruttura generale complessa e finalizzata ad uno stretto controllo dei flussi di aria e sostanze verso l'interno, e porre le premesse per successive indagini mirate alla crioconservazione di embrioni di parassitoidi all'interno delle uova di specie ospiti incluse in questo sottordine, naturali o di sostituzione. Nell'ambito delle indagini sulla penetrazione di crioprotettivi attraverso i differenti strati del rivestimento delle uova è stato realizzato anche uno studio sulla fine struttura del corion di *L. occidentalis* mediante l'utilizzo della microscopia elettronica a scansione.

Nel secondo sistema è stata verificata la possibilità di applicare la modalità di permeabilizzazione inserita nel protocollo di crioconservazione messo a punto per gli embrioni di *Galleria mellonella* (L.) (Roversi et al. 2008), per il trattamento di uova di questo lepidottero contenenti embrioni dell'ooparassitoide *Trichogramma brassicae* (Bezdenko). Gli studi effettuati negli ultimi anni su *G. mellonella* hanno infatti evidenziato la possibilità di crioconservare questo lepidottero utilizzando nelle prime fasi dei protocolli di crioconservazione trattamenti di permeabilizzazione meno drastici di quelli pubblicati in precedenza per il trattamento di Ditteri, con sostituzione dell'eptano con un trattamento a base di ipoclorito di sodio all'1,25% con Tween-80 per soli 2 minuti, in grado di assicurare una sopravvivenza del 68% delle uova permeabilizzate (Cosi et al., 2010).

INTRODUZIONE

Contesto Generale

L'allevamento massale di antagonisti naturali di insetti fitofagi nocivi per l'impiego in programmi di controllo biologico per la difesa di colture in pieno campo e in serra, costituisce una realtà di rilievo a livello mondiale che secondo recenti indagini interessa nella sola Europa 140 specie, per arrivare a più di 200 specie a livello mondiale, il 62,2% delle quali incluse tra gli Imenotteri (van Lenteren, 2012).

Anche con riferimento ad interventi da realizzarsi in aree protette e parchi naturali per controllare le invasioni biologiche di insetti e piante aliene invasivi, il controllo biologico sta ricevendo una attenzione crescente (Van Driesche *et al.*, 2010).

La produzione di insetti utili realizzata in apposite biofabbriche trova però un importante fattore limitante nella necessità di mantenere allevamenti in continuo delle specie utili e delle loro diverse varietà ed ecotipi utilizzabili in differenti contesti ambientali (Leopold, 1998).

Problematiche particolarmente rilevanti connesse alla riproduzione in laboratorio di artropodi utili sono riconducibili alle implicazioni relative alla necessità di disporre in tempi e quantità definite, spesso elevate, della vittima ospite o di ospiti alternativi. In laboratorio risulta infatti necessario sincronizzare i cicli di sviluppo dell'ospite, naturale o di sostituzione, e dell'antagonista naturale, per poter disporre di sufficienti quantità dell'agente di controllo biologico in coincidenza del presentarsi in natura della finestra di vulnerabilità del "pest" che si intende controllare. Non di rado a questo si aggiunge anche la necessità di controllare la fenologia delle piante sulle quali si alimentano gli ospiti utilizzati per la produzione massale degli organismi utili (van Lenteren e Tommasini, 2003; Postali Parra, 2010) .

A quanto sopra si è in parte ovviato con la messa a punto di substrati artificiali per l'allevamento di predatori e parassitoidi (Vanderzant, 1974; Thompson, 1986; Battisti et al., 1990; Liu et al., 1995; Grenier, 1997; Nordlung et al., 1997; Grenier e De Clercq, 2003), ma questo tipo di approccio risulta utilizzato in modo limitato per vari ordini di problemi (Consoli e Parra, 1999).

Nel caso dei microimenotteri ooparassitoidi, che rappresentano da sempre uno dei gruppi di antagonisti di maggiore rilievo e di più diffuso utilizzo in programmi di controllo biologico sia di tipo "classico" o "inoculativo" che afferenti a strategie di tipo "inondativo" (Li-Ying, 1994; Smith, 1994; Bin, 1994), la possibilità di disporre in ristretti periodi di tempo di un elevato numero di uova dell'ospite naturale o di sostituzione, in condizioni idonee per l'accettazione da parte delle femmine dell'oofago e per il successivo sviluppo embrionale, è elemento essenziale per la realizzazione degli stessi interventi.

E' interessante sottolineare che in vari casi gli ooparassitoidi non necessitano per il loro allevamento di uova vitali (Grenier, 1997), la qual cosa rende possibile il loro stoccaggio per lunghi periodi nell'ambito di un esteso range di temperature, da pochi gradi sopra 0°C fino a temperature ultrabasse. Vari Imenotteri ooparassitoidi appartenenti alle Superfamiglie Proctotrupopidea e Chalcidoidea sono stati infatti allevati con risultati interessanti su uova di ospiti di sostituzione conservate a freddo nelle quali si rileva un arresto dello sviluppo e la morte dell'embrione (Genduso, 1978; Ma, 1986; Corrêa-Ferreira e de Oliveira, 1998; Greco e Stilinovic, 1998; Kivan e Kilic, 2005; Chen e Leopold, 2007; Mahmoud e Lim, 2007; Alim e Lim, 2010).

In merito all'utilizzo in programmi di "long storage" (superiore al mese) di uova ospiti conservate a basse e ultrabasse temperature, vari Autori hanno sottolineato l'importanza di controllarne gli effetti non solo sulla generazione iniziale del

parassitoide ma anche sulle successive (van Lenteren, 2003; Chen e Leopold, 2007; Mahmoud e Lim, 2007 Alim e Lim, 2009, 2010).

Gli allevamenti di artropodi per interventi di lotta biologica, ma anche il mantenimento di specie modello o mutanti e linee transgeniche in condizioni di laboratorio per attività di ricerca, presentano inoltre non solo elevati costi di gestione ma anche potenziali rischi in merito al mantenimento della qualità delle popolazioni che devono essere riprodotte senza soluzioni di continuità, quali mantenimento della fitness degli esemplari prodotti, derive genetiche, diffusione di epizoozie, inquinamento degli allevamenti e problematiche tecniche di vario tipo legate alla gestione delle attrezzature (Leopold, 1991; Irdani *et al.*, 2011). Quanto sopra anche in considerazione del fatto che gli allevamenti vengono spesso realizzati a partire da un limitato numero di individui raccolti in aree ristrette (Sabbatini *et al.*, 2012).

Le basse temperature offrono la possibilità di stoccaggio al freddo come valida prospettiva, ma l'acqua è il componente principale degli organismi viventi ed in purezza inizia a congelare quando la temperatura scende al di sotto di 0°C causando danni alle strutture cellulari..

Quando un organismo è raffreddato ad una temperatura inferiore al punto di congelamento dei suoi fluidi inizia a formarsi ghiaccio nei tessuti, evento che superato un certo livello risulta di norma letale. In realtà la presenza di soluti nel corpo degli organismi viventi abbassa il punto di congelamento ben al di sotto dell'acqua pura.

Quando l'organismo è esposto a basse temperature le molecole d'acqua tendono ad avvicinarsi tra loro disponendosi per formare una struttura regolare, i cristalli di ghiaccio. Con la formazione di ghiaccio, i cui cristalli incorporano è bene ricordarlo solo le molecole di acqua, le altre molecole presenti nei fluidi vengono progressivamente confinate e concentrate, portando ad elevate concentrazioni di soluti che possono così

raggiungere livelli tossici per l'organismo. I violenti flussi di acqua determinati da queste irregolari concentrazioni di soluti possono inoltre di per se divenire causa di danni e rottura delle membrane.

La formazione del ghiaccio inizia negli spazi intercellulari dove accrescendosi aumenta la disidratazione delle cellule. Con il congelamento le cellule finiscono poi per rimanere schiacciate dai cristalli di ghiaccio. Non bisogna inoltre dimenticare che i cristalli di ghiaccio presenti in una soluzione possono modificarsi con graduale comparsa di cristalli di maggiore dimensioni: fenomeno indicato con il termine di ricristallizzazione che si accompagna ad ulteriori danni meccanici alle cellule per sfondamento delle membrane (Roversi, dati non pubblicati).

Basse temperature e organismi viventi

- a. Organismi che evitano di essere esposti a freddi troppo intensi
- b. Organismi in grado di resistere alle basse temperature

Dato che le temperature possono scendere in natura ben al di sotto di 0°C una moltitudine di animali e piante ha evoluto soluzioni al problema. Gli organismi possono essere esposti a temperature inferiori a 0°C stagionalmente, come succede nelle regioni temperate, o con periodicità giornaliera, come si verifica nelle aree montane tropicali per l'escursione termica giorno/notte.

Nelle zone temperate la possibilità degli artropodi di sopravvivere alle basse temperature invernali è uno dei fattori più importanti nel determinare non solo l'iniziale possibilità di una specie di insediarsi stabilmente in un ambiente o in una certa fascia altimetrica ma anche il variare della densità numerica delle popolazioni da una generazione all'altra influenzando direttamente sulla stessa dinamica di popolazione.

A monte di tutto ciò e non ignorabile in quanto fenomeno che condiziona fortemente la risposta degli organismi alle basse temperature, vi è il più diffuso fenomeno di adattamento a superare periodi sfavorevoli da parte degli artropodi che indichiamo genericamente come "dormienza", che a sua volta include sia la "quiescenza" che la "diapausa" (Danks,1987).

Con la quiescenza ci riferiamo ad una risposta immediata ad un fattore limitante, alte o basse temperature ad esempio. Con la diapausa intendiamo invece una sospensione di gran parte dei processi metabolici che si verifica in un preciso stadio vitale dell'organismo e prende avvio nell'organismo stesso da segnali esterni che

precedono le condizioni sfavorevoli e spesso non sono neanche direttamente collegati a quest'ultime.

Le strategie evolutive messe in atto dagli insetti per sopravvivere all'esposizione a basse temperature, potenzialmente letali per questi organismi, possono essere ricondotte a due tipologie di base: sviluppare una elevata tolleranza al congelamento o evitare il congelamento sviluppando una elevata capacità di super raffreddarsi al di sotto del punto di congelamento senza che si formi ghiaccio.

Parliamo di cold hardiness o tolleranza al congelamento riferendoci alla capacità di evitare i danni derivanti dalla trasformazione in ghiaccio dei fluidi interni basata su adattamenti biochimici e fisiologici.

E' importante ricordare che tra gli insetti i gruppi che maggiormente interessano per il loro impiego in programmi di lotta biologica, includono per lo più parassitoidi, i quali sia che si tratti di endo- che di ecto-parassitoidi sono in vari casi legati ai siti di svernamento delle loro vittime. La limitazione raggiunge il massimo di rigidità per gli ooparassitoidi che svernano all'interno dell'uovo della vittima: in questo caso le condizioni del sito di svernamento sono completamente predeterminate dal comportamento di ovideposizione delle femmine che hanno deposto le uova attaccate (Boivin, 1994).

Nella categoria degli insetti con elevate capacità di tollerare marcati abbassamenti delle temperature si distinguono specie tolleranti al congelamento (freezing tolerant), se sopportano la formazione di ghiaccio intracorporeo, distinguendoli da altre specie che, al contrario, non tollerano il congelamento (freezing intolerant) e pertanto non sono in grado di sopravvivere alla formazione di ghiaccio.

Insetti che non tollerano il congelamento

Specie	Stadio	Punto di congelamento (°C)	Crioprotettivo	Bibliografia
<i>Rhabdophaga</i> sp. (Diptera: Cecidomyiidae)	Larva	-62	Glicerolo	(Ring, 1981; Ring, 1983)
<i>Rhabdophaga strobilioides</i> (Diptera: Cecidomyiidae)	Larva	-58	Glicerolo	(Miller e Verner, 1987)
<i>Mayetiola rigidae</i> (Diptera: Cecidomyiidae)	Larva	-58	Glicerolo	(Miller e Verner, 1987)
<i>Euura</i> sp. (Hymenoptera: Tenthredinidae)	Larva	-56	Glicerolo	(Miller e Verner, 1987)
<i>Coccinella quinque-notata</i> (Coleoptera: Coccinellidae)	Adulto	-24	Nessuno	(Ring, 1981; Ring, 1983)
<i>Papilio canadensis</i> (Lepidoptera: Papilionidae)	Pupa	-27	Etilene Glicole	(Kukal <i>et al.</i> , 1981)

Insetti che tollerano il congelamento

Specie	Stadio	Temperatura di congelamento (°C)	Crioprotettivo	Bibliografia
<i>Pythoplanus</i> (Coleoptera: Pythidae)	Larva	-7	Glicerolo	(Ring, 1981; Ring e Tesar, 1981; Ring, 1983)
<i>Martyrhilda ciniflorella</i> (Lepidoptera: Oecophoridae)	Adulto	-23	Glicerolo	(Miller, 1978; Miller, 1982)
<i>Gynaephora groenlandica</i> (Lepidoptera: Lymantriidae)	Larva	-8	Glicerolo Alanina Betaina	Kukal <i>et al.</i> , 1988; Kukal <i>et al.</i> , 1991)
<i>Mycetophila</i> sp. (Diptera: Mycetophilidae)	Adulto	-33	Glicerolo	(Miller, 1978; 1982)
<i>Exechia</i> sp. (Diptera: Mycetophilidae)	Adulto	-33	Glicerolo	(Miller, 1978; Miller, 1982)
<i>Xylophagus</i> sp. (Diptera: Xylophagidae)	Larva	-6	Nessuno	(Ring, 1981; Ring, 1983)
<i>Pontania</i> sp. (Hymenoptera: Tenthredinidae)	Larva	-9	Sorbitolo	(Ring, 1981; Ring, 1983)
<i>Rogas</i> sp. (Hymenoptera: Braconidae)	Adulto	-30	Glicerolo (?)	(Miller, 1978)

Tabella 1 - Temperature di congelamento e crioprotettivi rilevati in insetti artici e subartici. Tabella rielaborata da Danks *et al.* (1994).

Freezing tolerant organisms: Gli organismi in grado di tollerare il congelamento hanno sviluppato adattamenti che favoriscono la formazione di ghiaccio a temperature non molto al di sotto dello zero (subfreezing temperatures) ($-5^{\circ}\text{C} \div -8^{\circ}\text{C}$) grazie alla presenza nel sistema digestivo o nell'emolinfa di elementi che favoriscono la formazione di ghiaccio. Non costituisce certamente elemento di novità ma è importante ricordare che negli insetti l'emolinfa non è confinata in un sistema circolatorio chiuso ma riempie quasi completamente la cavità corporea. Favorire la formazione di ghiaccio a temperature relativamente elevate è per le specie "freezing tolerant" essenziale, in quanto a temperature molto al di sotto dello zero la cristallizzazione procede molto rapidamente, aumentando le probabilità di danni alle cellule anche per il tumultuoso aumento di pressione osmotica.

Freezing intolerant organisms: Gli organismi che non tollerano la formazione di ghiaccio hanno bisogno di ritardare il più possibile la formazione di ghiaccio (ovvero spostare verso temperature più basse il punto di congelamento). L'obiettivo può essere raggiunto non ingerendo o eliminando le sostanze che favoriscono la formazione di ghiaccio (ice nucleating agents) o ancora concentrando in determinate parti del corpo queste sostanze. Per taluni insetti è stata dimostrato che nel periodo antecedente la cattiva stagione cessa l'attività di alimentazione nonostante fonti di cibo risultino ancora disponibili. In altri casi è stata rilevata una forte disidratazione allo scopo di aumentare la concentrazione di soluti. In altre specie ancora a ciò si aggiunge o si sostituisce un'altra strategia basata sulla sintesi di sostanze anticongelanti per lo più a basso peso molecolare (come glicerolo, sorbitolo, mannitolo, etilenglicole e glucosio).

Questi adattamenti rendono questi organismi capaci di superare l'inverno in uno stato "sottoraffreddato" nel quale i danni causati dalle basse temperature sono ridotti al minimo. In questi organismi le sostanze anticongelanti possono abbassare notevolmente

il punto di congelamento basti pensare che nel caso di alcuni Imenotteri il punto di congelamento è stato individuato a -60°C (Ring e Tesar, 1981).

Il caso degli ooparassitoidi è caratterizzato da uno scenario peculiare: in primo luogo gli ooparassitoidi possono beneficiare dell'intrinseca resistenza al freddo delle uova ospiti che di norma costituiscono lo stadio dei fitofagi con il più basso punto di congelamento (Somme, 1982), anche per la presenza di sostanze anticongelanti quali materiali che entrano nella formazione degli embrioni in fase di sviluppo. In questi come in altri parassitoidi il glicerolo, il più comune crioprotettivo a basso peso molecolare è parte di un sistema a multicomponenti grazie al quale può essere raggiunta una elevata resistenza al freddo senza risentire degli effetti tossici di elevate concentrazioni di un singolo crioprotettivo (Zachariassen, 1985):

E' peraltro da tenere presente che durante il loro periodo di sviluppo all'interno della vittima, gli endoparassitoidi devono proteggere dal congelamento non solo se stessi ma anche l'ambiente che li circonda, ovvero l'ospite. Il congelamento dell'ospite può infatti risultare fatale per la larva del parassitoide che si sta sviluppando all'interno. Nello stesso tempo a fronte di un impegnativo investimento energetico per la sintesi di crioprotettivi, ne possono derivare per gli endoparassitoidi indubbi vantaggi, in quanto la sopravvivenza dell'entomofago può essere ottenuta favorendo una maggiore concentrazione di sostanze tossiche anticongelanti nel solo ospite. Al riguardo val la pena sottolineare che gran parte dei parassitoidi utilizzabili in programmi di controllo biologico vengono stoccati come forme più o meno immature proprio all'interno dei loro ospiti (Roversi, dati non pubblicati).

Stoccaggio a lungo termine di insetti

Lo stoccaggio a lungo termine, con conservazione finale degli organismi animali a temperature ultrabasse può essere realizzato con due procedure di base definibili come “raffreddamento lento” e “vittrificazione”.

La tecnica di “raffreddamento lento”, usata fin dagli anni '70 per la crioconservazione degli embrioni di vertebrati (Whittingham et al., 1972; Willadsen, 1977; Zeilmaker et al., 1984; Saragusty e Arav, 2011) è risultata non applicabile a gran parte degli embrioni di Insetti, per l'estrema sensibilità dimostrata da questi esapodi nei riguardi dell'esposizioni anche per periodi brevi a temperature comprese tra -10°C e -30°C (Heacox et al., 1985; Mazur et al., 1992a; Miles e Bale., 1995; Strong-Gunderson et al. 1989).

La tecnica della “vittrificazione”, basata su di un rapidissimo abbassamento delle temperature accompagnato dall'impiego di crioprotettivi destinati ad impedire la formazione di ghiaccio e consentire la “transizione vetrosa”, applicata a partire dagli anni '90 da Rall e Fahy (1985a, 1985b) alla crioconservazione embrioni di topo, è stata adattata con positivi risultati alla crioconservazione di embrioni di *Drosophila melanogaster* (Steponkus et al. 1990; Mazur et al. 1992; Steponkus e Caldwell, 1993).

La transizione vetrosa (o “vittrificazione”) è il termine con cui si identifica la transizione di fase subita da un liquido che si trasforma in stato amorfo senza che si verifichino fenomeni di cristallizzazione. E' possibile raggiungere questa condizione quando l'aumento della viscosità è tale da ostacolare il riarrangiamento delle molecole in una struttura ordinata, come si verifica in sistemi sufficientemente concentrati o raffreddati in modo estremamente rapido (Fuller *et al.*, 2004). La transizione liquido-vetro si osserva frequentemente in polimeri ed in liquidi che possono essere

sottoraffreddati molto al di sotto del punto di fusione della fase cristallina. Questo tipo di transizione è considerata atipica sotto molti punti di vista; il primo di questi è che non è una transizione termodinamica tra due stati di equilibrio, come può essere quella tra acqua e ghiaccio, tanto da far supporre che lo stato vetroso sia uno stato di transizione intermedio tra stadio liquido e cristallino (Zarzycki, 1991; Ojovan e Lee, 2010).

Durante un normale processo di raffreddamento è possibile rilevare un macroscopico aumento di viscosità della soluzione, dovuto ad un calo graduale della quantità di moto delle particelle. In un raffreddamento rapido invece si osserva un rapido arresto dei moti traslazionali delle molecole, che si traduce a livello macroscopico nella formazione di un materiale altamente viscoso, caratterizzato da proprietà ibride tra quelle dei solidi e dei liquidi, che mantiene il riarrangiamento molecolare caotico dei liquidi ma ha proprietà meccaniche caratteristiche dei solidi (Steponkus, 1997). L'arresto dei moti traslazionali delle molecole include anche l'arresto dei moti Browniani delle particelle e l'ottenimento di ciò che si definisce "stasi molecolare".

Il secondo motivo per cui la transizione vetrosa non è considerata una vera transizione termodinamica bensì una transizione anomala è che la componente cinetica del processo è la principale forza che descrive il processo. Da un punto di vista pratico una sostanza vitrificata si può assimilare ad un liquido troppo freddo o viscoso per consentire alle molecole di scivolare le une sulle altre. Lo stato vetroso è stato modellizzato dal punto di vista fisico come uno stato di "quenched disorder"; il modello accettato prevede che i parametri termodinamici e meccanici descriventi lo stato vetroso siano dipendenti dalle modalità con cui è avvenuta la trasformazione di stato ma non evolvano nel tempo al termine della trasformazione (Bouchaud e Mézard, 1994).

Uno studio puntuale ed esaustivo di ciò che avviene durante il raffreddamento rapido in organismi viventi è complicato non solo dalla difficile modellizzazione del

processo in se ma anche dalla complessità degli organismi e da problemi di natura strettamente tecnologica. Tutte queste variabili sarebbero da considerare allo stesso tempo se si volesse provare a descrivere ciò che avviene quando un organismo viene rapidamente raffreddato a temperature inferiori al punto di congelamento. Informazioni importanti sono state ottenute studiando il comportamento di molecole ad alto peso molecolare, capaci di interagire con le molecole d'acqua tramite legami ad idrogeno (Franks e Symons, 1977).

Questi studi hanno fornito un primo approccio qualitativo al comportamento dello stato vitrificato dei fluidi cellulari durante il raffreddamento ed il riscaldamento. A questo scopo si sono rivelati particolarmente utili particolari rappresentazioni dei diagrammi di fase comprendenti sia dati delle fasi all'equilibrio che quelli in non-equilibrio (Fuller *et al.*, 2004).

Il diagramma di fase rappresenta i punti ai quali una soluzione di concentrazione nota congelerà (o fonderà) in condizioni di equilibrio a seguito di cambiamenti della temperatura. La curva rappresenta il limite di coesistenza delle due fasi della stessa soluzione e la porzione della curva che descrive il cambiamento di stato tra solido e liquido è chiamata "curva di liquefazione". Il raffreddamento di una soluzione al di sotto della curva di liquefazione porta alla formazione di ghiaccio qualora le condizioni siano favorevoli alla sua nucleazione, ciò fa sì che eventuali soluti diventino più concentrati nella fase liquida. Per questo motivo è un evento abbastanza raro che in condizioni normali il congelamento inizi realmente al punto di liquefazione (T_m); ciò che accade tipicamente è che la soluzione vada incontro ad un leggero sotto-raffreddamento prima che avvenga la nucleazione e la crescita dei cristalli di ghiaccio (Fahy, 1995; Mehl, 1997).

La stabilità dello stato vitrificato presenta pari importanza rispetto alla stessa vittrificazione. Sebbene dal punto di vista fisico lo stato vitrificato di una soluzione pura

sia sufficientemente stabile a fini pratici, la stessa cosa non la si può dire di soluzioni contenenti un gran numero di possibili centri di nucleazione.

Nei sistemi biologici, la presenza di macromolecole di notevoli dimensioni (proteine, polimeri saccaridici, etc.) circondate da molecole d'acqua di idratazione sembrerebbe assimilabile ad una situazione con possibili centri di nucleazione per la formazione di cristalli di ghiaccio, ma le osservazioni svolte hanno evidenziato che tale evento risulta sfavorito per i forti legami che uniscono le molecole d'acqua di idratazione alle macromolecole (North, 1981; Grout e Morris, 1987).

La stabilità è stata definita empiricamente come la velocità critica di raffreddamento (o riscaldamento considerando il processo inverso) V_{cr} oltre la quale le molecole costituenti il campione non hanno abbastanza tempo per organizzarsi in un reticolo cristallino prima che si raggiunga la temperatura di fusione (T_m). Altro modo per definire la stabilità dello stato vitrificato sfrutta la dipendenza sia di T_m che della temperatura di devitrificazione (T_d) dalla velocità di raffreddamento; la differenza tra $T_m - T_d$ ad una data velocità di raffreddamento è considerata misura sperimentale della stabilità dello stato vitrificato (Boutron e Kaufmann, 1979; Boutron *et al.*, 1986). Adottando questa definizione la velocità di raffreddamento critica è definita come quel valore della velocità di raffreddamento che non consente alla soluzione di cristallizzare o di devitrificare ($T_m - T_d = 0$).

Per favorire la stabilità dello stato vitrificato di un campione biologico è stato proposto di sostituire parte del contenuto d'acqua con molecole favorevoli la vittrificazione chiamate "crioprotettivi". Una molecola può essere definita crioprotettiva sulla base della sua curva di fusione, in particolare quando T_m e V_{cr} sono inferiori a quelli misurati per l'acqua. Le molecole più comuni che mostrano queste caratteristiche sono: glicerolo, dimetilsolfossido ed etilenglicole ma anche 1,2-propandiolo e butan-2,3-

diolo (Boutron e Kaufmann, 1979). In tab. 2 sono riportati le velocità di raffreddamento critiche di soluzioni al 45% contenenti i più comuni crioprotettivi. I crioprotettivi sono però molecole che hanno una caratteristica sfavorevole, individuabile nella loro tossicità (Fahy et al., 2004; Branden e Tooze, 1991), in particolare quando utilizzati alle concentrazioni richieste per stabilizzare lo stato vitrificato.

Da un punto di vista pratico si è osservato come sia possibile riformulare la composizione delle soluzioni di vitrificazione, aggiungendo ad alte concentrazioni di un crioprotettivo ad alto Vcr ma bassa tossicità, piccole concentrazioni di un secondo crioprotettivo a basso Vcr ma elevata tossicità (Mehl and Boutron 1988). Benché la stabilità dello stato vitrificato di una soluzione acquosa di crioprotettivi può essere migliorata da prove in vitro, la sua applicazione in vivo a sistemi biologici deve essere sempre testata direttamente caso per caso.

Velocità critica di raffreddamento (V_{cr}) di alcuni crioprotettivi	
L2,3-Butandiolo	<2.5 °C/min
1,3-Butandiolo	7 °C/min
1,2-Propandiolo	10 °C/min
1,2,3- Butantriolo	11 °C/min
Dimetilsolfossido	14 °C/min
Dimetilformamide	23 °C/min
Dietilformamide	48 °C/min
1,4-Butandiolo	71 °C/min
Etilenglicole	260 °C/min
Glicerolo	380 °C/min
1,3-Propandiolo	1100 °C/min

Tabella 2 - Velocità critica di raffreddamento di soluzioni acquose al 45% di crioprotettivi comunemente usati in applicazioni criogeniche. Rielaborata da Sutton (1992).

Una caratteristica comune ai protocolli di vitrificazione finora elaborati è rappresentata dal passaggio attraverso 4 distinte fasi:

Fase 1: Permeabilizzazione

L'organismo viene reso permeabile all'ambiente esterno in modo da far sì che la soluzione di crioprotettivi possa penetrare all'interno.

Fase 2: Introduzione di crioprotettivi

L'organismo viene imbibito in una soluzione di crioprotettivi. Al fine di aumentare la concentrazione delle molecole introdotte è possibile far seguire a questo passaggio un'ulteriore fase di disidratazione.

Fase 3: Vitrificazione

L'organismo al cui interno sono penetrati i crioprotettivi viene rapidamente portato a temperature ultrabasse con una velocità dell'ordine di 20.000 °C/min mediante immersione del campione in azoto liquido, esposizione a vapori di azoto o inserimento in ultracongelatori.

Fase 4: Riscaldamento e rimozione dei crioprotettivi

In quest'ultima fase la struttura vitrificata viene rapidamente riscaldata (i.e. velocità di 6.000 °C/min) provvedendo all'eliminazione dei crioprotettivi.

Basandosi sulle conoscenze progressivamente acquisite sui fenomeni di rallentamento del metabolismo e di resistenza alle basse temperature in condizioni di "vita sospesa", già nella prima metà degli anni '30 King iniziò a studiare gli effetti dello stoccaggio a freddo di un microimenottero ooparassitoide del Genere *Trichogramma* e della sua vittima allo stadio di uovo *Ephestia kuehniella* la comune tignola della farina, seguito negli stessi anni da altri entomologi affacciatisi in questo settore di studi (Schread e Garman, 1934; Hanna, 1935).

Varie ricerche hanno poi riguardato nel tempo il mantenimento di organismi utili per periodi più o meno brevi a temperature di poco superiori o inferiori allo zero, anche

con riferimento a predatori, ad esempio Antocoridi come *Orius laevigatus* stoccato per periodi superiori al mese a temperature comprese tra 3°C e 13°C (Rudolf et al., 1993).

Molti degli studi sono stati incentrati sui fattori in grado di adeguare la risposta alla basse temperature invernali di insetti di ambienti temperati con particolare riferimento alla preprogrammazione o preconditionamento, che operando con modifiche fisiologiche e biochimiche sull'organismo o sui progenitori rende possibile la sopravvivenza per brevi o lunghi periodi a basse temperature altrimenti letali.

Già nel 1959 Salt aveva rilevato in un Imenottero Braconide, *Bracon cephi* parassitoide di un coleottero dannoso alle graminacee, l'aumento della resistenza alle basse temperature proprio in coincidenza con l'entrata in diapausa. Nel seguito vari ricercatori si sono indirizzati a scandagliare le possibilità di sfruttare diapausa e quiescenza per facilitare lo stoccaggio prevalentemente a breve termine di organismi utili e delle loro vittime, per l'utilizzo in programmi di lotta biologica, in taluni casi incorporando questi accorgimenti in programmi industriali di allevamento massale.

Ai fini di utilizzare il preconditionamento per migliorare la sopravvivenza alla crioconservazione gli allevamenti possono essere preventivamente sottoposti a condizioni che in natura segnalano l'approssimarsi dell'inverno: ad esempio esponendo preventivamente lotti di organismi da conservare allevati in primavera-estate a condizioni di fotoperiodo artificialmente assimilate a quelle autunnali.

Gran parte delle ricerche sono state però indirizzate a verificare le potenzialità di utilizzo di temperature prossime a 0° o per lo più di poco superiori (Canard, 1971; Kok e McAvoy, 1983; Gilkeson, 1990; Tauber et al., 1993).

Solo a partire dalla fine degli anni '70 inizi degli anni '80 gli studi hanno iniziato a riguardare la risposta di insetti a temperature ultrabasse e i danni del congelamento, incentrandosi prevalentemente ma non in modo esclusivo sulle possibilità di stoccaggio

di embrioni e uova di Ditteri.^a La conservazione a bassissime temperature basata sull'utilizzo di vitrificanti è risultata l'unica strada praticabile. La vitrificazione sfrutta infatti la capacità di sostanze crioprotettive ad alta concentrazione di evitare la cristallizzazione dell'acqua durante il raffreddamento. Il più comune crioprotettivo accumulato dagli Insetti è il glicerolo anche se alcune specie ad esempio di coleotteri lo hanno sostituito con altre sostanze (Gauthier *et al.*, 1998).

Organismo da laboratorio per eccellenza la *Drosophila* ha permesso di evidenziare la non idoneità per gli insetti dei metodi di crioconservazione basati su protocolli che prevedevano una lenta discesa termica e il successivo stoccaggio in azoto liquido a -196°C, fino a quel momento adottati per altri organismi animali, (Heacox *et al.*, 1985; Mazur *et al.*, 1992b).

Le indagini sulla *Drosophila* hanno evidenziato al contrario l'essenzialità di proteggere questi organismi con adeguate concentrazioni di crioprotettivi e realizzare un processo di vitrificazione e non di congelamento, con velocità di raffreddamento elevate per far sì che si realizzi il passaggio dallo stato liquido ad una struttura vetrosa (Mazur *et al.*, 1992b; Steponkus e Caldwell, 1993).

E' stato infatti solo dopo la scoperta che l'immersione in azoto liquido forniva la necessaria estrema velocità di raffreddamento e l'abbinamento con un successivo quasi altrettanto rapido riscaldamento, che lo stoccaggio a freddo di artropodi e nematodi è divenuto possibile. In questa fase gli studi sullo stoccaggio a temperature ultrabasse hanno iniziato a toccare anche insetti entomofagi utili, alcuni tutt'oggi allevati commercialmente come *Aphidoletes aphidimyza* distribuito in programmi di lotta biologica per il controllo di afidi di colture di pregio in serra (Miles e Bale, 1996).

L'ordine degli imenotteri racchiude un elevato numero di specie di rilevante importanza sia economica che ecologica (LaSalle e Gould, 1993), ma fino ad oggi, se si

escludono studi svolti prevalentemente su *Apis mellifera* L. (Harbo, 1983; Peng et al., 1992; Ronglin et al., 1997; Collins e Mazur, 2006; Li et al 2010), non sono disponibili lavori riguardanti la messa a punto per questi importanti esapodi di protocolli di vitrificazione.

Gli sviluppi nel campo della criobiologia e della crioconservazione degli Insetti hanno aperto interessanti prospettive per la messa a punto di protocolli specie-specifici per lo stoccaggio a temperature criogeniche non solo di altri Ditteri ma più di recente anche di Lepidotteri con l'utilizzo di ultracongelatori meccanici (Roversi et al., 2008), in grado di mantenere la temperatura dei campioni al di sopra dei -196°C , ottenibili con l'utilizzo di azoto liquido, ma inferiore alla soglia di -130°C , considerato un valore limite per il mantenimento del blocco di ogni attività metabolica.

Specie	Percentuali di sopravvivenza				
	Età degli embrioni (25°C)	Embrioni (%)	Larvæ ad adulti (%)	Resa totale (%)	
Diptera					
<i>Drosophila melanogaster</i>	14.3 h	58.0	43.0	25.0	(Mazur <i>et al.</i> , 1992a)
	14.9 h	68.0	37.0		(Steponkus e Caldwell, 1993)
<i>Lucilia cuprina</i>	6.50 h	20.2	0	0	(Leopold e Atkinson, 1999)
<i>Anastrepha suspensa</i>	42 h (27°C)	46.5	N.R.	N.R.	(Wang <i>et al.</i> , 2000a)
	TH stage	37.4 ± 9.0	61.0 ^(*)	22.8	(Leopold <i>et al.</i> , 2010)
<i>Musca domestica</i>	14.5 h	57.1	10.2 ^(*)	5.4	(Wang <i>et al.</i> , 2000b)
<i>Culicoides sonorensis</i>	12-14 h	40.1	46.9 ^(*)	18.8	(Nunamaker e Lockwood, 2001)
<i>Cochliomyia hominivorax</i>	V.D.	52.5 ± 2.1	16.0 ^(*)	12.0	(Leopold <i>et al.</i> , 2001)
<i>Ceratitis capitata</i>	27.0 h (29°C)	47.3 ± 0.7	74.6 ^(*)	34.9	(Rajamohan <i>et al.</i> , 2003)
<i>Anastrepha ludens</i>	TH stage	49.1 ± 12.2	59.2 ^(*)	29.2	(Rajamohan e Leopold, 2007)
Lepidoptera					
<i>Spodoptera exigua</i>	45.0 h (27°C)	1.6 ± 1.1	0	-	(Guang-Hong <i>et al.</i> , 2001)
<i>Galleria mellonella</i>	24.0 h (30°C)	1.6 ± 0.5	92.9 ± 4.1	1.5	(Roversi <i>et al.</i> , 2008)
Hymenoptera					
<i>Apis mellifera</i>	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	(Li <i>et al.</i> , 2010)

Tabella 3 - Percentuali di sopravvivenza di embrioni di insetti inclusi nei Ditteri, Lepidotteri e Imenotteri ottenuti applicando protocolli di vitrificazione diversi. (*) Percentuale calcolata; V.D. – Stadio embrionale definito morfologicamente; N.R. – Valore non riportato.

MATERIALI E METODI

Gli allevamenti dei due ospiti sono stati condotti in camere climatizzate con controllo di temperatura e illuminazione. I test sono stati effettuati in celle climatizzate Binder KBWF con controllo temperatura, fotoperiodo e UR. Le osservazioni dirette sono state fatte utilizzando uno stereomicroscopio Nikon SMZ – 1500 equipaggiato con illuminazione a luce fredda. Per le osservazioni sulla fine struttura del corion di *L. occidentalis* è stato utilizzato un Microscopio Elettronico a Scansione Jeol JCM-5000.

Origine della popolazione di *Leptoglossus occidentalis* e allevamento

La colonia di *L. occidentalis* utilizzata in questo lavoro è stata costituita utilizzando esemplari wild, catturati in Toscana nel Comune di Reggello (Provincia di Firenze), tenuti in camere climatizzate con temperatura costante di 26°C, fotoperiodo 16:8 e Umidità Relativa del 50%. Gli esemplari sono stati immessi in gabbie delle dimensioni di 20 cm x 20 cm x 60 cm rivestite di rete di nylon con maglia di 2x2 mm con all'interno piantine di 3 anni di *Pinus pinea* alte circa 40 cm e cotone costantemente imbevuto con acqua. Adulti e immaturi del Coreide sono stati allevati in gabbie separate e ad entrambi è stato fornito come pabulum un mix di semi di *Pinus nigra* e di *Arachis hypogaea*, che sono stati sostituiti tre volte la settimana (Sabbatini *et al.*, 2012, 2013). In ciascuna gabbia è stato mantenuto un numero massimo di 45 coppie di adulti, individuato come numero ottimale per favorire la deposizione ed evitare al contempo fenomeni di competizione e disturbo intraspecifico (Benassai, dati non pubblicati).

Prima di iniziare le prove si provveduto a riprodurre il fitofago per 3 generazioni consecutive in condizioni standardizzate.

Introduzione dal Nord America, caratterizzazione molecolare e allevamento di *Gryon pennsylvanicum*

Il ceppo di *G. pennsylvanicum*, indicato con la sigla GP-BC-1, è stato raccolto in British Columbia (Canada) ed introdotto in Italia nel 2010 nell'ambito di un progetto finalizzato nazionale del Ministero per le Politiche Agricole Alimentari e Forestali, con autorizzazione del Servizio Fitosanitario Centrale e del Servizio Fitosanitario Regionale della Toscana (Roversi et al., 2011). L'identificazione morfologica della specie è stata eseguita dal Prof. Virgilio Caleca dell'Università di Palermo (Italia).

Il DNA genomico è stato estratto da 5 individui di *G. pennsylvanicum* GP-BC-1 conservati in alcool 95% per 24 ore utilizzando il kit di estrazione ZR Tissue and Insect DNA MicroPrep commercializzato dalla ZymoResearch. Alcuni passaggi del protocollo di estrazione sono stati modificati rispetto a quanto suggerito dal produttore nel modo seguente:

- Il campione è stato omogeneizzato in 400 µl di Lysis solution a cui sono stati aggiunti altri 1000 µl di Lysis Buffer + 5.0 µl di β-mercaptoetanol.
- È stato eliminato il passaggio di filtrazione
- L'eluizione finale è avvenuta in un unico passaggio, utilizzando un volume di 30 µl di DNA Elution buffer.

La qualità del DNA estratto è stata valutata per elettroforesi su gel di agarosio e la sua concentrazione stimata tramite spettrofotometro (SmartSpec Plus, BIORAD).

L'amplificazione della regione barcode del gene CO1 è stata effettuata con la coppia di primer (FOLMER et al. 1994):

LCO-1490 (5' -GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')

HCO-2198 (5' -TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')

La reazione di PCR è stata effettuata in un volume di 50 µl con una concentrazione di DNA genomico di 150 ng, una concentrazione di MgCl₂ di 17.5 mmol e 2.0 U di Taq polimerasi (AppliChem). La temperatura di annealing dei primer utilizzata è stata di 60°C e 45 il numero di cicli di amplificazione eseguiti. L'amplificazione è stata verificata con corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.5%. Il sequenziamento è stato eseguito al CIBIACI – Università di Firenze.

La sequenza è stata inserita nel database Nucleotide NCBI ed indicizzata sotto l'accession number JX968492 ed è disponibile all'URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/409246356>.

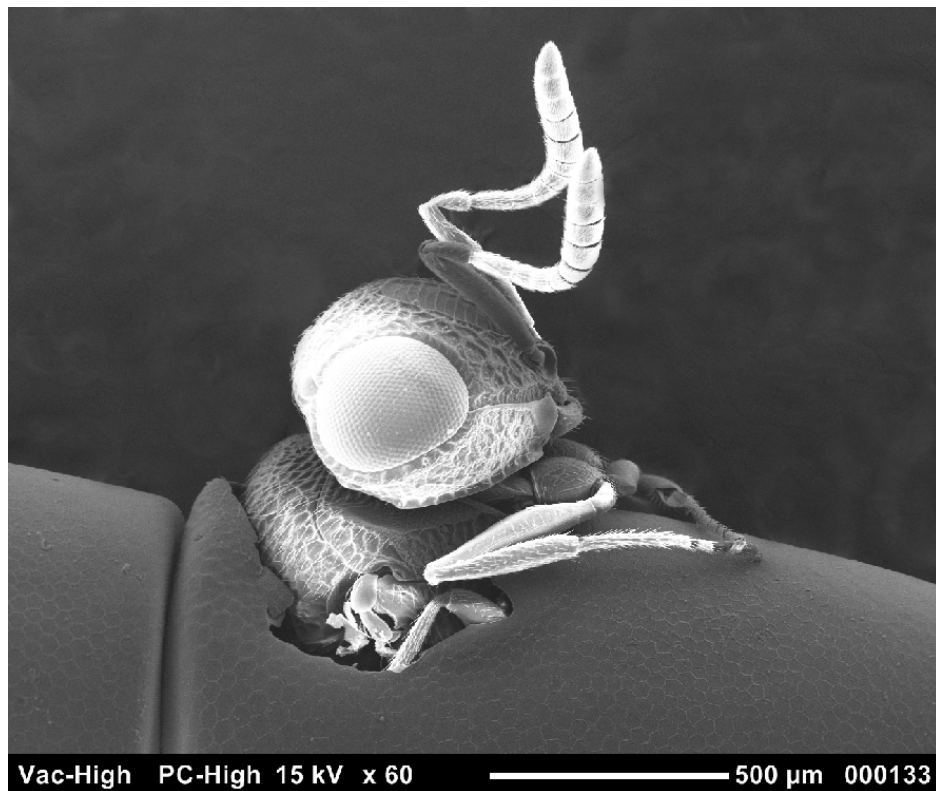


Fig. 1 – Adulto di *Gryon pennsylvanicum* in fase di sfarfallamento da un uovo di *Leptoglossus occidentalis*.

La colonia di *G. pennsylvanicum* GP-BC-1 è stata mantenuta in tubi di vetro di lunghezza 150 mm e diametro 20 mm, chiusi ad ambo le estremità da una rete a maglie di 250µm. Agli adulti del Platigastride è stato fornito miele “ad libitum” usando la tecnica della goccia su cartoncino; per evitare proliferazioni fungine il miele è stato rimpiazzato 3 volte alla settimana. L'ooparassitoide è stato riprodotto fornendo alle femmine fecondate uova di *L. occidentalis* sicuramente indenni raccolte non più di 24 ore prima negli allevamenti in camera climatizzata. 24 ore dopo l'esposizione alle femmine di *G. pennsylvanicum* le ovature con uova parassitizzate del Coreide sono state trasferite in altri tubi di vetro. Adulti di *G. pennsylvanicum* e uova parassitizzate sono stati mantenuti in cella climatizzata BINDER in condizioni di $26 \pm 1^\circ \text{C}$, $75 \pm 5\%$ umidità relativa e 16:8 di fotoperiodo sulla base di quanto noto sulle esigenze di *G. pennsylvanicum* e di altre specie affini di Coreidi Neartici (Nechols *et al.*, 1989; Vogt e Nechols, 1993; Romeis *et al.*, 2000; Dasilao e Arakawa, 2004; Canto-Silva *et al.*, 2006).

La colonia è stata acclimatata per più di 10 generazioni prima di impiegare gli esemplari negli esperimenti.

Influenza della temperatura e del tempo di stoccaggio delle uova di *Leptoglossus occidentalis* sulla parassitizzazione e sullo sviluppo di *G. pennsylvanicum*

Dalla colonia di *L. occidentalis* sono state prelevati 5 gruppi di ovature deposte al massimo 24 ore prima. I gruppi sono stati conservati alle temperature di $+ 4^\circ \text{C}$, $- 20^\circ \text{C}$, $- 80^\circ \text{C}$ e $- 140^\circ \text{C}$, ogni gruppo è stato successivamente suddiviso in quattro sottogruppi per i quali il periodo di stoccaggio è durato 1, 2, 3 e 6 mesi. Il quinto

gruppo è stato mantenuto alla temperatura di 26°C in camera climatizzata e utilizzato come controllo.

Per la temperatura di +4°C e -20°C è stato usato il frigo/freezer KW® KRFDE 2711NIA (KW Apparecchi Scienifici, Monteriggioni, Italia), per la temperatura di -80°C un ultracongelatore meccanico Haier® ULT Freezer DW86L388 (Haier, Qingdao, PRC), mentre la temperatura di -140°C è stato utilizzato un ultracongelatore meccanico Revco® UltimaII Cryogenic Freezer (Revco, Waltham, MA. - USA). Le uova da congelare alle temperature di +4°C e -20°C sono state raccolte in capsule Petri sigillate con Parafilm®M (Pechiney Plastics Packaging, Chicago, Ill. - USA) mentre quelle conservate a -80°C e -150°C sono state raccolte in cryovials.

Passato il periodo di stoccaggio previsto, le ovature sono state prelevate dai contenitori di stoccaggio e offerte a femmine di *G. pennsylvanicum* di 1 giorno già accoppiate ma senza esperienza di parassitizzazione, alloggiate singolarmente in tubi di vetro. Dopo 6 ore le ovature sono state ritirate e tenute in tubi separati fino all'eventuale sfarfallamento dei parassitoidi.

I test di parassitizzazione sono stati condotti in cella climatizzata Binder KBWF720 (Binder, Tuttlingen, Germania) in condizioni standard di temperatura $26 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ umidità relativa e fotoperiodo 16:8. Ogni combinazione di temperatura e tempo di stoccaggio è stata replicata 10 volte.

Influenza della temperatura di stoccaggio delle uova di *Leptoglossus occidentalis* sulla fitness di adulti F1 di *Gryon pennsylvanicum*

La fitness della progenie è stata valutata utilizzando un protocollo modificato rispetto a quello adottato per specie del genere *Trichogramma* (van

Lenteren, 2003), utilizzato di recente per *G. pennsylvanicum* (Sabbatini Peverieri *et al.*, 2013).

Femmine adulte di *G. pennsylvanicum*, scelte in modo casuale tra gli esemplari sfarfallati da ovature di *L. occidentalis* stoccate alle differenti temperature testate, sono state nutrite con miele e mantenute con maschi della stessa origine per 24 ore. Successivamente le femmine sono state isolate in nuovi tubi di allevamento nei quali nel primo, terzo e quinto giorno, a ciascuna femmina sono state esposti tre lotti di uova di *L. occidentalis* deposte al massimo da 24 ore. Dopo ulteriori 24 ore le ovature parassitizzate sono state tolte dai contenitori con le femmine e immesse in tubi vuoti mantenuti alle stesse condizioni di temperatura, umidità e fotoperiodo precedentemente descritte fino allo sfarfallamento dei parassitoidi. Gli esemplari F1 ottenuti da queste ovature sono stati utilizzati per verifiche sulla fecondità, sex ratio e durata dello sviluppo preimaginale.

Morfologia e struttura del corion delle uova di *Leptoglossus occidentalis*

Per lo studio di dettaglio della morfologia e della ultrastruttura del corion di *L. occidentalis* sono stati utilizzati tre differenti protocolli di fissazione.

Protocollo 1

Le uova del Coreide sono state sciacquate 15 minuti in 0.1 M buffer cacodilato a pH 7.2 per 2 volte, immerse in 2.5% glutaraldeide buffer cacodilato overnight a 4.0° C e nuovamente risciacquate 15 minuti per due volte in buffer cacodilato. La disidratazione è stata effettuata tramite immersione per 15 minuti nella serie degli alcool (etanolo al 30 %, 50%, 70%, 90% e 99.9%). L'eccesso di etanolo è stato rimosso usando carta da filtro.

Protocollo 2

Per rimuovere gli strati cerosi esterni si è provveduto ad immergere le uova in una soluzione al 99.98% di eptano per 15 minuti. Di seguito è stato applicato integralmente il precedente protocollo 1.

Protocollo 3

Le uova sono state sciacquate per 15 minuti in 0.1 M buffer fosfato a pH 7.3 per 2 volte per rimuovere polvere e detriti, fissate in 2.5% glutaraldeide buffer fosfato per 1 ora a 4.0° C e in seguito sciacquate per due volte per 15 minuti ogni volta in buffer fosfato. La post-fissazione è stata eseguita in una soluzione composta da 1.0% tetrossido di osmio in buffer fosfato a cui sono seguiti due ulteriori sciacqui di 15 minuti in buffer fosfato. La disidratazione è stata effettuata tramite immersione per 15 minuti nella scala ascendente degli alcool (etanolo al 30 %, 50%, 70%, 90% e 99.9%). L'eccesso di etanolo è stato rimosso usando carta da filtro.

Per tutti i campioni la metallizzazione con oro colloidale è stata effettuata con strumentazione JEOL JFC-1300. Le osservazioni di microscopia elettronica a scansione sono state effettuate utilizzando la strumentazione JEOL JCM-5000 controllata dal software JCM-5000 (NeoScope) vers. 1.01 .

Le misurazioni sono state effettuate su dieci uova isolate da altrettante ovature indipendenti.

Test di permeabilità delle uova di *Leptoglossus occidentalis*

Al fine di svolgere indagini sulla permeabilità del corion di *L. occidentalis* e valutare le possibilità di introdurre all'interno sostanze crioprotettive in grado di contrastare la formazione di ghiaccio, uova del *Coreide* sono state trattate con tecniche di colorazione istologica.

Dalle colonie di laboratorio di *L. occidentalis* sono state raccolte ovature deposte al massimo da 12 ore, dalle quali sono state isolate, scegliendole a caso, 40 uova che sono state suddivise in due gruppi di 20 che sono state sciacquate in PBS per rimuovere polvere e detriti.

Il primo gruppo è stato colorato per 30 minuti alla temperatura di + 25°C con una soluzione al 5.0 % di cristalvioletto in etanolo. Il secondo gruppo è stato colorato, per lo stesso tempo ed alla stessa temperatura, con una soluzione acquosa al 2.0% di blu di toluidina. Di seguito le uova poste su vetrini sono state osservate con uno stereomicroscopio Nikon SMZ-2000 equipaggiato con sensore CMOS DS-Fi1.

Un ulteriore lotto di ovature di *L. occidentalis* deposte da 10-12 ore, è stato prelevato dalla colonia di laboratorio e suddiviso in 10 gruppi di 50 uova ciascuno. 5 gruppi sono stati immersi per 0, 10, 20, 30 e 60 minuti in una soluzione al 99.9% di eptano, mentre gli altri 5 gruppi sono stati trattati per gli stessi tempi con PBS. Le uova sono state successivamente asciugate all'aria per 5 minuti e sciacquate di nuovo in PBS per rimuovere eventuali residui. Dopo essere state asciugate su carta da filtro le uova sono state mantenute in cella climatizzata a $26.0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, $75 \pm 5\%$ di umidità relativa e fotoperiodo 16:8 fino all'eventuale schiusura.

A seguito dei risultati ottenuti in questa prima prova di permeabilità effettuata con uova deposte da 10-12 ore immerse in eptano, sono stati realizzati ulteriori test di permeabilità su uova di *L. occidentalis* deposte di recente, a partire dalle fasi precedenti l'imbrunimento del corion. Dalla colonia del Coreide sono stati pertanto isolati due gruppi di adulti di 10 coppie ciascuno che sono stati posti in due gabbie separate e mantenuti per 3 giorni in condizioni standard di allevamento.

A partire dal 4 giorno una delle gabbie è stata utilizzata per controlli visivi finalizzati a definire l'intervallo di tempo necessario alle uova per assumere la

colorazione definitiva. A tale scopo, tenuto conto dell'intensificarsi dell'attività di ovideposizione della cimice a partire dalle ore pomeridiane (Benassai, dati non pubblicati), a partire dalle 4:00 pm si è provveduto ad ispezionare visivamente la gabbia ad intervalli di 10 min. Nel caso in cui venivano rilevate femmine in ovideposizione, si provvedeva a continuare l'osservazione diretta avendo cura di segnare i tempi di inscurimento.

Nella seconda gabbia, per la quale è stata adottata la stessa metodologia di osservazione ad intervalli di 10 min, sono state prelevate 50 ovature subito dopo che le femmine di *L. occidentalis* avevano terminato l'ovideposizione. Le ovature raccolte sono state suddivise in 5 gruppi di 10 ovature, ciascuna contenente almeno 10 uova. Un primo gruppo di 10 ovature neodeposte è stato utilizzato come testimone è immesso in cella climatizzata a $26.0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, $75 \pm 5\%$ di umidità relativa e fotoperiodo 16:8 fino all'eventuale schiusura. Un secondo gruppo di 10 ovature è stato suddiviso in due sottogruppi di 5, che sono stati immersi in una soluzione di eptano al 99,9% subito dopo la raccolta, rispettivamente per 5 e 30 min. Gli altri tre gruppi di 10 ovature ciascuno sono stati lasciati rispettivamente per 1, 2 e 3 ore in cella climatizzata e solo successivamente suddivisi in due sottogruppi ciascuno e trattati con eptano per 5 e 30 min. Tutte le ovature trattate dopo l'immersione in soluzione di eptano sono state lasciate asciugare all'aria per 5 min, risciacquate in PBS e dopo asciugatura su carta da filtro inserite in cella climatizzata per i successivi controlli sulla percentuale di sopravvivenza.

Origine della colonia ed allevamento di *Galleria mellonella*

Le uova di *Galleria mellonella* utilizzate per l'allevamento di *Trichogramma brassicae* sono state prelevate da una colonia di questo piralide mantenuta in camera climatizzata presso i laboratori del CRA-ABP, costituita a partire da un lotto di individui inviati dalla Dr.ssa Maria Luisa Dindo dell'Università di Bologna. Le gabbie di allevamento del Lepidottero sono state provviste nella parte superiore di ampi fori che venivano chiusi con fogli di carta per favorire l'ovideposizione su questo substrato agevolmente asportabile. In ciascuna gabbia di allevamento sono stati posti 100-150 adulti, con una sex ratio di circa 1:1. Le larve di *G. mellonella* sono state alimentate con una dieta artificiale (25.0 % Miele millefiori; 11.25% Cera d'api (preventivamente sciolta); 12.50% Glicerina; 12.50% Farina di mais; 12.50% Farina integrale di grano; 25.00% Farina raffinata di grano; 12.50% Latte in polvere; 6.25% Estratto di lievito). La dieta artificiale è stata sterilizzata a 100°C per 3 ore prima del suo utilizzo. In ciascuna scatola sono stati forniti 20 grammi di dieta ogni settimana. le gabbie di allevamento sono state mantenute a 28°C e 60 % di umidità relativa, con un fotoperiodo di 12 : 12.

Origine ed allevamento del ceppo di *Trichogramma brassicae*

Il ceppo di *Trichogramma brassicae* (TbBio-1) è stato fornito dalla Biocare (Germany) che ha provveduto all'invio di circa 1.000.000 di uova parassitizzate di *Sitotroga cerealella* sottoposte ad un preventivo trattamento di 1 settimana di esposizione a basse temperature. Dopo l'arrivo ai laboratori del CRA-ABP di Firenze le uova di *Sitotroga* sono state suddivise in 6 gruppi, inserite in tubi di vetro lunghi 15 cm e larghi 2 cm, chiusi alle estremità con una rete a maglie di 250µ, e poste in cella climatizzata a 26°C, 75 ± 5% di umidità relativa e fotoperiodo 16:8. Gli sfarfallamenti di

T. brassicae sono iniziati dopo 5 giorni dall'arrivo al laboratorio CRA e sono proseguiti per ulteriori 4 giorni. Gli adulti di *T. brassicae* sfarfallati dalle uova di *Sitotroga* sono stati trasferiti in altri tubi di allevamento, provvedendo a fornire miele in gocce come alimento e ovature di *G. mellonella* deposte da non più di 24 ore.

Date le problematiche sollevate dalla presenza delle larve del lepidottero negli allevamenti in cella climatizzata, è stata testata l'idoneità per la parassitizzazione di *T. brassicae*, di ovature contenenti embrioni uccisi mediante esposizione a basse temperature: a tale scopo 13 ovature sono state mantenute per 3 ore a -20°C, trattamento sufficiente a determinare la morte degli embrioni (Roversi et al., 2008), mentre 10 ovature con embrioni vitali sono state utilizzate come controllo. Le ovature sono state esposte ad adulti di *T. brassicae* per 48 ore e successivamente messe in allevamento. Terminato lo sviluppo del parassitoide si è provveduto al controllo delle percentuali di parassitizzazione e della quota di adulti di *Trichogramma* regolarmente sfarfallati.

Dopo l'effettuazione dei test preliminari sulle uova di *G. mellonella* con embrioni uccisi mediante esposizione a basse temperature l'allevamento dell'ooparassitoide è stato mantenuto utilizzando solo questo tipo di uova dell'ospite di sostituzione, mediante esposizione per 48 ore delle uova di *Galleria* e successivo allevamento in cella climatizzata settata sulle stesse caratteristiche indicate in precedenza.

Decorionizzazione delle uova di *Galleria mellonella* parassitizzate da *Trichogramma brassicae*

Dopo 4 giorni dall'esposizione agli adulti di *T. brassicae*, 20 ovature di *G. mellonella* con uova parassitizzate sono state divise in due gruppi di 10 ovature

ciascuno. L'intervallo di 4 giorni è stato utilizzato in quanto dopo questo periodo nelle uova parassitizzate dal *Trichogramma* diviene possibile rilevare visivamente un inscurimento uniforme del corion, che permette di individuare con sicurezza le uova al cui interno si stanno sviluppando embrioni dell'ooparassitoide. Il primo gruppo di ovature è stato trattato per due minuti con una soluzione al 4% di sodio ipoclorito (Carlo Erba) + 0,001% di Tween 80® (Sigma Chemical Co, St. Luis, Mo). Il secondo gruppo è stato trattato con PBS. Entrambi i gruppi di ovature sono stati successivamente risciacquati 2 volte in PBS per 2 minuti ad ogni passaggio e asciugati su carta da filtro.

Tutte le ovature sono state manipolate sotto cappa e infine collocate in piastre Petri precedentemente riempite con 30 ml di agarosio 1,5% + 0,05 g/ml di nipagina sodica per evitare lo sviluppo di funghi. le piastre sono inoltre state sigillate con film di paraffina e collocate in cella climatizzata Binder alla temperatura di 26°C, 75 ± 5% di umidità relativa e fotoperiodo 16:8.

Caricamento dei crioprotettivi nelle uova parassitizzate di *Galleria mellonella*

Altre 30 ovature di *G. mellonella*, preventivamente trattate per 2 ore a -20°C , sono state immesse in tubi con adulti del *Trichogramma* e mantenute in cella per 4 giorni. Dopo tale periodo le ovature sono state divise in 3 gruppi di 10 ciascuno.

Le ovature sono quindi state sottoposte ad un trattamento di decorionizzazione mediante trattamento con una soluzione di 4% ipoclorito di sodio + 0,01% di Tween80 per 2 minuti e sciacquate due volte in PBS per altri 2 minuti.

Un primo gruppo di ovature è stato quindi immerso in una soluzione 1.8M di etilenglicole per 1 ora a temperatura di +25°C, successivamente le ovature sono state

passate in una soluzione al 34 % di etilenglicole + 5.4 % di polietilenglicole + 15.5 % di trealosio per 30 minuti a 0°C.

Il secondo ed il terzo gruppo di ovature sono state trattate con solo PBS. Il secondo gruppo per 1,00 ora alla temperatura di +25°C e per 30 minuti alla temperatura di 0°C, il terzo gruppo per 1,50 ore alla temperatura costante di +25°C.

Dopo i trattamenti tutte le ovature sono state asciugate su carta da filtro e mantenute in capsule Petri contenenti circa 30 ml di una soluzione di 1.5% agar microbiologico + 0.05 g/ml di nipagina sodica per impedire la proliferazione di funghi. Le capsule Petri sono state chiuse con un film plastico paraffinato e incubate in cella climatizzata alla temperatura di +26°C, 75 ± 5% di UR e fotoperiodo 16:8.

Al termine dello sviluppo si è provveduto per i successivi 7 giorni al controllo giornaliero dei tubi per rilevare l'eventuale sfarfallamento di adulti del Tricogrammatide. Trascorso tale tempo le ovature sono state controllate al microscopio stereoscopico per conteggiare le uova parassitizzate con parassitoidi morti all'interno, avendo cura di controllare lo stadio di sviluppo dei Tricogrammi non sfarfallati.

ANALISI DEI DATI E PROCEDURE STATISTICHE ADOTTATE

I dati sono stati raccolti a intervalli regolari, con particolare riferimento alla sex ratio e la vitalità della progenie, ed elaborati per valutare l'incidenza dei vari livelli di temperatura e periodi di stoccaggio.

E' stata adottata l'Analisi della Varianza per valutare l'incidenza della temperatura e della lunghezza dello stoccaggio sulla sopravvivenza della progenie e sul rapporto maschi/femmine. Al fine di normalizzare le percentuali i dati sono stati sottoposti a trasformazione angolare (arcoseno della radice del valore) (Sokal e Rohlf, 1997).

Una volta registrato un effetto significativo del fattore temperatura e/o tempo di conservazione, i confronti tra medie sono stati effettuati con il test post hoc di Tukey al livello $\alpha = 0,05$. Nel caso di significatività dell'analisi preliminare è stata studiata la correlazione, con calcolo del coefficiente di Spearman, e la regressione dei valori di sopravvivenza in relazione alle differenti temperature e ai tempi di stoccaggio testati.

Le elaborazioni statistiche sono state fatte con software statistico SPSS 13.0 (SPSS, 2005).

RISULTATI

Influenza della temperatura e del tempo di stoccaggio delle uova di *Leptoglossus occidentalis* su parassitizzazione e sviluppo di *G. pennsylvanicum*

I risultati ottenuti mostrano che le uova di *L. occidentalis* stoccate per periodi differenti a temperature basse e ultrabasse variabili da +4°C a – 140°C, sono accettate dalle femmine di *G. pennsylvanicum* e consentono lo sviluppo degli embrioni del parassitoide fino all'ottenimento di adulti, ma con percentuali di sfarfallamento significativamente differenti tra le diverse temperature ($F_{df=4, 137} = 3,814$, $P = 0.006$) (fig. 2).

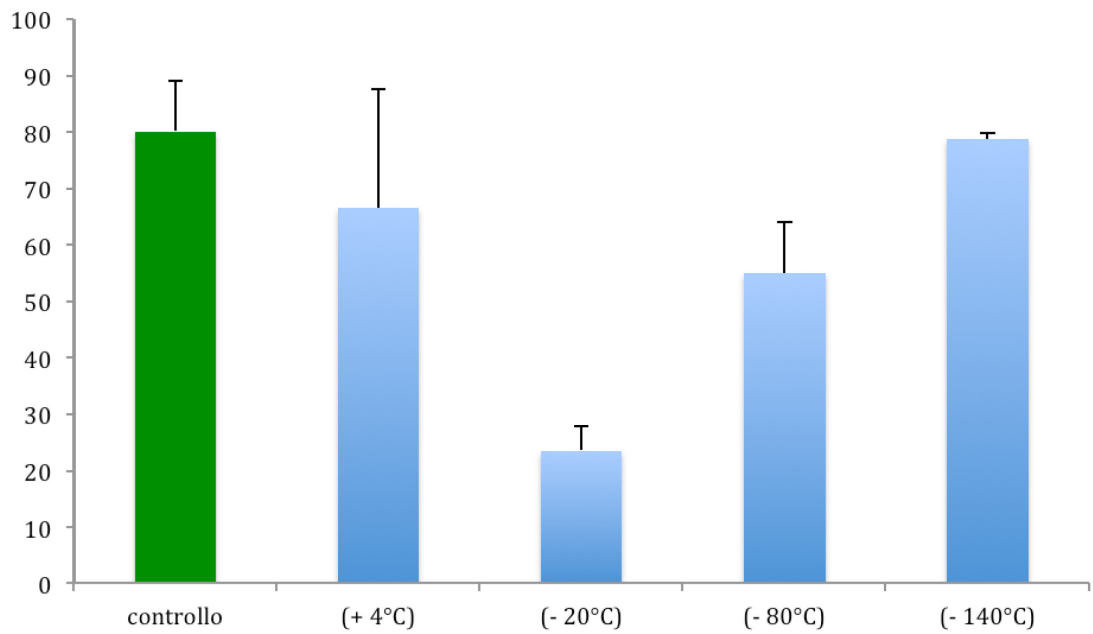


Figura 2 – Percentuali complessive di sfarfallamento di adulti di *Gryon pennsylvanicum* da uova di *Leptoglossus occidentalis* stoccate a, +4°C, -20°C, - 80°C e -140°C. Nel controllo le uova sono state mantenute a 26°C. Le barre indicano l'errore standard.

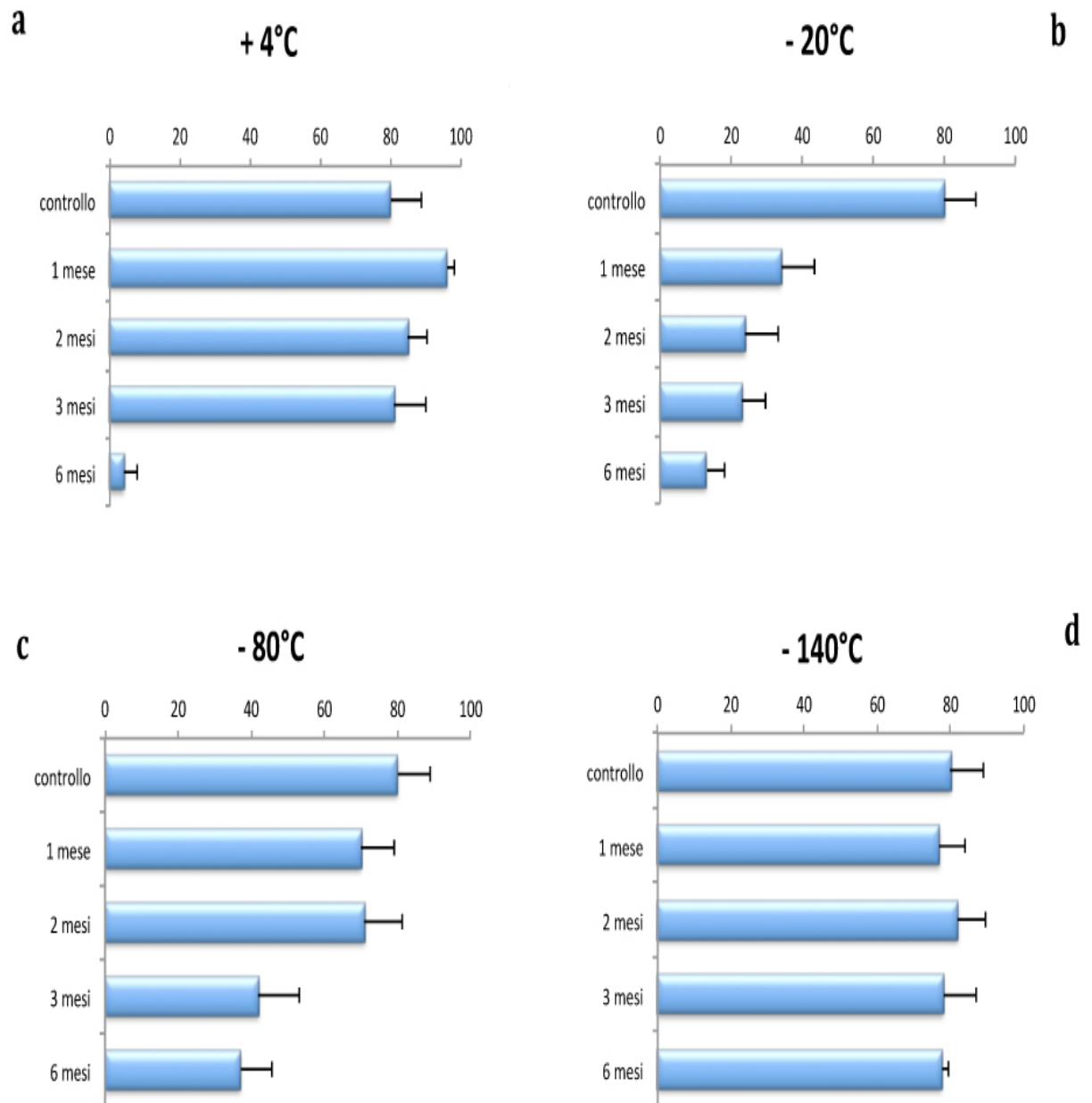


Figura 3 – Percentuali di uova di *Leptoglossus occidentalis* stoccate per 1, 2, 3 e 6 mesi alle temperature di + 4°C (a), - 20°C (b), - 80°C (c) e - 140°C (d) da cui sono regolarmente sfarfallati adulti di *Gryon pennsylvanicum*. Le barre indicano l'errore standard.

Considerando gli effetti dei differenti periodi di stoccaggio, per le 4 temperature testate considerate singolarmente, si rileva che nel caso delle uova di *L. occidentalis* tenute a + 4°C la conservazione incide significativamente sulle percentuali di sfarfallamento di *G. pennsylvanicum*. Dopo i primi 3 mesi, durante i quali i valori ottenuti sono risultati superiori al controllo (80,0% \pm 9,0) variando da un massimo del 96,0% (\pm 2,2) a un minimo dell'81,0% (\pm 9,0), si è registrato un crollo per le uova stoccate per 6 mesi, con una percentuale di uova parassitizzate con successo dal Platigastride del 40,0% (\pm 3,8) (fig. 3a).

L'utilizzo della temperatura di -20°C ha fornito risultati nettamente diversificati rispetto alle altre 3 temperature utilizzate per le prove di conservazione delle uova del Coreide. Nelle uova stoccate a - 20°C la percentuale di sfarfallamenti dell'ooparassitoide è infatti scesa in modo significativo rispetto al controllo già dopo 1 mese attestandosi su di un valore medio pari al 34,0% (\pm 9,4), per raggiungere il minimo dopo 6 mesi con il 13,5% (\pm 5,3) (fig. 3b).

Nel caso della conservazione a - 80°C, per i primi due mesi la percentuale di uova da cui sono regolarmente sfarfallati adulti di Gryon non ha fatto registrare variazioni di rilievo rispetto alle uova del controllo, rispettivamente con il 70,0% (\pm 9,1) per 1 mese e il 71,0% (\pm 10,2) per lo stoccaggio a 2 mesi. Una netta diminuzione degli sfarfallamenti è stata invece rilevata per le uova conservate per 3 mesi (42,0 % \pm 11,2) e 6 mesi (37,0% \pm 8,7) (fig. 3c).

Le uova di *L. occidentalis* stoccate in ultracongelatori meccanici alla temperatura di - 140°C per 1-6 mesi sono state accettate con successo da *G. pennsylvanicum* in tutti i test, con un massimo dell'82,0% (\pm 7,6) per le uova di 2 mesi ed un minimo del 77,0% (\pm 6,9) nel caso delle uova di 1 mese, senza evidenziare per nessuno dei periodi testati differenze significative rispetto al controllo (fig. 3d).

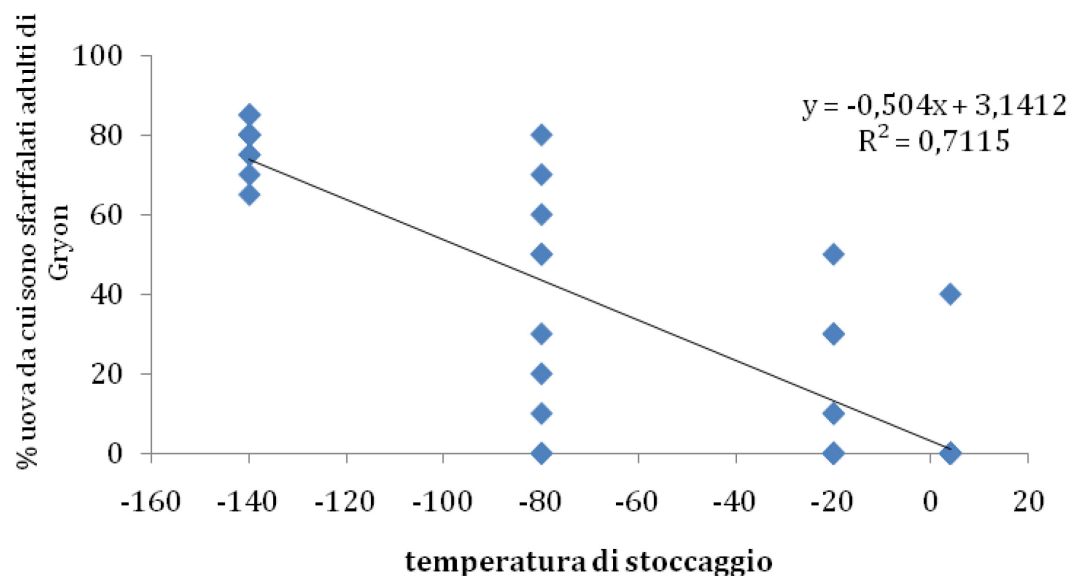


Fig. 4 –Percentuali di uova di *Leptoglossus occidentalis* stoccate per 6 mesi alle temperature di + 4°C (a), - 20°C (b), - 80°C (c) e - 140°C (d), da cui sono regolarmente sfarfallati adulti di *Gryon pennsylvanicum*. Dati riferiti a 10 ovature/tesi.

Con riferimento complessivo allo stoccaggio per il solo periodo di 6 mesi è emersa una correlazione significativa nell'intervallo (+ 4°C) – (- 140°C), tra temperatura di conservazione delle uova di *L. occidentalis* e idoneità di questo Coreide per l'allevamento di *G. pennsylvanicum* (Indice di correlazione di Pearson = 0,819) (fig. 4).

La sex-ratio degli esemplari di *G. pennsylvanicum* sfarfallati dalle uova conservate da + 4°C a - 140°C per 1-6 mesi, si è mantenuta costantemente sbilanciata verso la produzione di femmine dell'ooparassitoide, oscillando da una quota minima del 75 % sul totale adulti nati, per le uova ospiti stoccate a + 4°C per 6 mesi, ad un massimo del 91,7% ($\pm 7,6$) per le uova tenute a - 20°C per 2 mesi, senza differenze significative tra le 4 differenti temperature utilizzate per la conservazione a lungo termine delle uova del Coreide ($F_{df=4, 137} = 0,221$, $P = 0.926$) (fig. 5, tab.4).

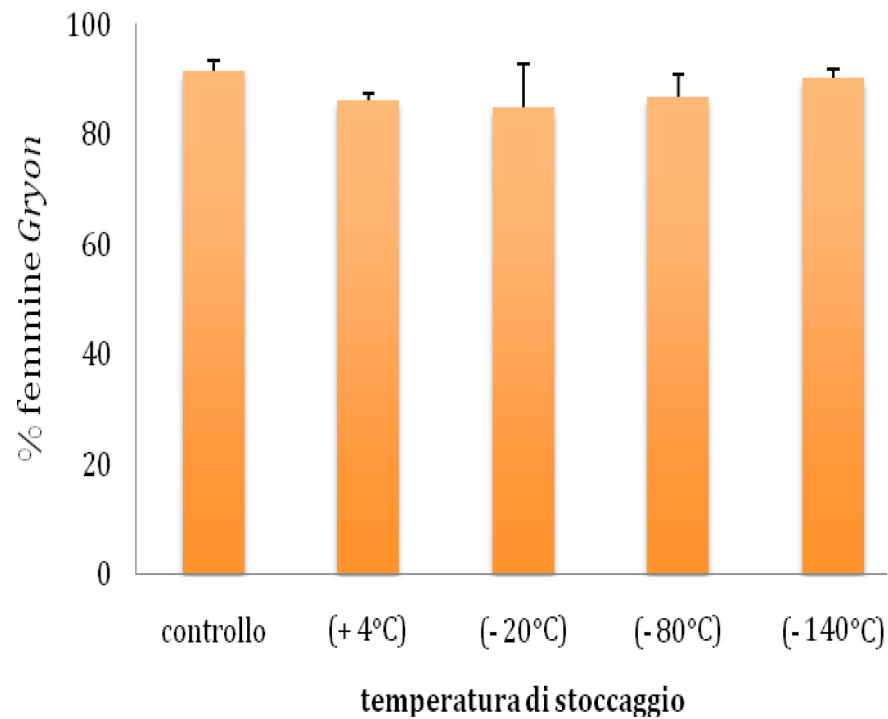


Figura 5 – Percentuale femmine *Gryon pennsylvanicum* sul totale parassitoidi sfarfallati da uova di *Leptoglossus occidentalis* stoccate a, +4°C, -20°C, - 80°C e -140°C. Nel controllo le uova sono state mantenute a 26°C. Le barre indicano l'errore standard.

		% femmine	ES
+ 4°C	controllo	91,3	2,0
	1 mese	90,6	1,0
	2 mesi	88,6	1,5
	3 mesi	90,0	1,3
	6 mesi	75,0	0,0
- 20°C	1 mese	82,5	4,6
	2 mesi	91,7	7,6
	3 mesi	79,2	12,1
	6 mesi	86,7	7,1
- 80°C	1 mese	90,4	2,9
	2 mesi	86,5	2,9
	3 mesi	84,2	5,3
	6 mesi	85,4	5,6
- 140°C	1 mese	91,5	1,8
	2 mesi	89,6	1,2
	3 mesi	90,3	2,0
	6 mesi	89,8	0,4

Tabella 4 – Percentuale femmine di *Gryon pennsylvanicum* sul totale parassitoidi sfarfallati da uova di *Leptoglossus occidentalis* stoccate per 1 - 6 mesi a temperature variabili da + 4°C a - 140°C.

Influenza della temperatura di stoccaggio delle uova ospiti sulla fitness della discendenza di adulti di *Gryon pennsylvanicum* ottenuti da uova stoccate a temperature basse e ultrabasse

La discendenza degli adulti di *G. pennsylvanicum* sviluppatasi in uova conservate a basse e ultrabasse temperature non ha fatto registrare differenze significative per quanto attiene il numero medio discendenti/femmina (tab. 5).

Anche in relazione alla sex ratio si evidenzia come nella discendenza la percentuale di femmine non si sia discostata significativamente dal controllo, i cui valori sono stati superati per tutti i periodi di stoccaggio nella F1 ottenuta dagli adulti nati da uova conservate – 140°C.

		Numero medio F1/femmina	Err. St.	% femmine in F1	Err. St.
+ 4°C	Controllo	55,6	2,8	91,0	0,7
	1 mese	50,3	2,7	91,7	0,7
	2 mesi	61,1	2,4	90,6	1,1
	3 mesi	51,2	5,0	91,3	0,9
	6 mesi	49,3	2,9	88,1	1,3
- 20°C	1 mese	65,5	5,3	92,9	0,8
	2 mesi	63,7	3,7	90,3	0,7
	3 mesi	57,3	1,5	89,7	0,8
	6 mesi	41,5	3,0	87,7	1,0
- 80°C	1 mese	50,3	1,7	93,1	1,0
	2 mesi	58,4	2,3	89,6	0,7
	3 mesi	62,5	2,3	92,1	0,6
	6 mesi	61,1	1,9	92,1	0,6
- 140°C	1 mese	57,1	4,4	91,6	0,8
	2 mesi	52,1	2,6	91,2	0,7
	3 mesi	54,3	3,5	91,9	1,0
	6 mesi	55,3	2,8	91,7	1,0

Tabella 5 – “Quality control” effettuato sulla generazione F1 di *Gryon pennsylvanicum* discendente da femmine e maschi nati da uova stoccate a basse e ultrabasse temperature, sviluppatasi in uova di *Leptoglossus occidentalis* deposte da meno di 24 ore. Alle femmine di *Gryon* sono state esposte 50 uova/giorno per tre giorni non consecutivi.

Morfologia e struttura del corion delle uova di *Leptoglossus occidentalis*

Le osservazioni visive condotte in camera climatizzata alla temperatura costante di 26°C hanno permesso di rilevare che subito dopo la deposizione le uova si presentano di colore giallo chiaro, virano verso il marrone chiaro nei primi 15 minuti e assumono il colore marrone definitivo completando i processi di melanizzazione dopo circa 1 ora. Negli ultimi giorni prima della schiusura, quando all'interno è riconoscibile la presenza delle neanidi formate, il corion subisce un ulteriore cambiamento di colore divenendo bruno-rossiccio.

Le uova di *L. occidentalis*, deposte in file sugli aghi delle piante ospiti, di forma semicilindrica con asse principale orientato orizzontalmente ed un evidente pseudopercolo, sono lunghe $1,76 \pm 0,05$ mm e larghe $1,26 \pm 0,08$ mm. La superficie esterna è pari a $4,7 \pm 0,2$ mm² e il volume stimato è di $1,1 \pm 0,1$ mm³. Lo pseudopercolo ha forma circolare con un diametro di $0,80 \pm 0,06$ mm ed è localizzato in prossimità del polo anteriore (figura 6A). Nella porzione inferiore, parzialmente appiattita, le uova mostrano una placca centrale oblunga di secreto ghiandolare, che dopo il distacco dall'ago mantiene l'impronta delle righe stomatifere, con cui la femmina del Coreide fissa le uova all'ago (fig. 6B). Nella porzione anteriore l'uovo è interessato per l'intera circonferenza da un anello di 18 ± 4 (ES) tubercoli, che attraversano anche lo pseudopercolo, di spessore pari a 6 ± 2 μm, con lume del canale interno in cui sboccano gli areopili di 3 ± 1 μm (fig. C, E). In prossimità dell'estremità anteriore delle uova si osservano piccole aperture infossate, disposte in gruppi di numero variabile fino ad un massimo 10 (fig. F).

L'indagine al microscopio elettronico a scansione di sezioni delle uova del Coreide ha permesso di rilevare che il corion si presenta come una struttura nettamente stratificata, con esocorion di 3.2 μm, mesocorion di 5.0 μm ed endocorion di 1.8 μm (fig. 7 A,B). L'esocorion presenta struttura trabecolare con piccoli e sporadici canali trasversali posti

nella porzione mediana dello spessore, e contiene inoltre una serie di cavità di maggiori dimensioni, di forma circolare, sottostanti i tubercoli aereopilari (figg.7 C, D). Al SEM il mesocorion appare come uno strato spesso di materiale compatto con occasionali strie longitudinali e stretti e rari canali trasversali (figg. 7 C). L'endocorion ha una struttura spugnosa e trabecolata che non presenta una conformazione regolare ed è interessata da una fitta rete di spazi interconnessi (figg. 7 A, B) e nel lato interno mostra rigonfiamenti lenticolari, risultati persistenti anche in porzioni di corion trattate con solventi per eliminare eventuali residui dello strato ceroso sovrastante la membrana vitellina (figg. 7 F).

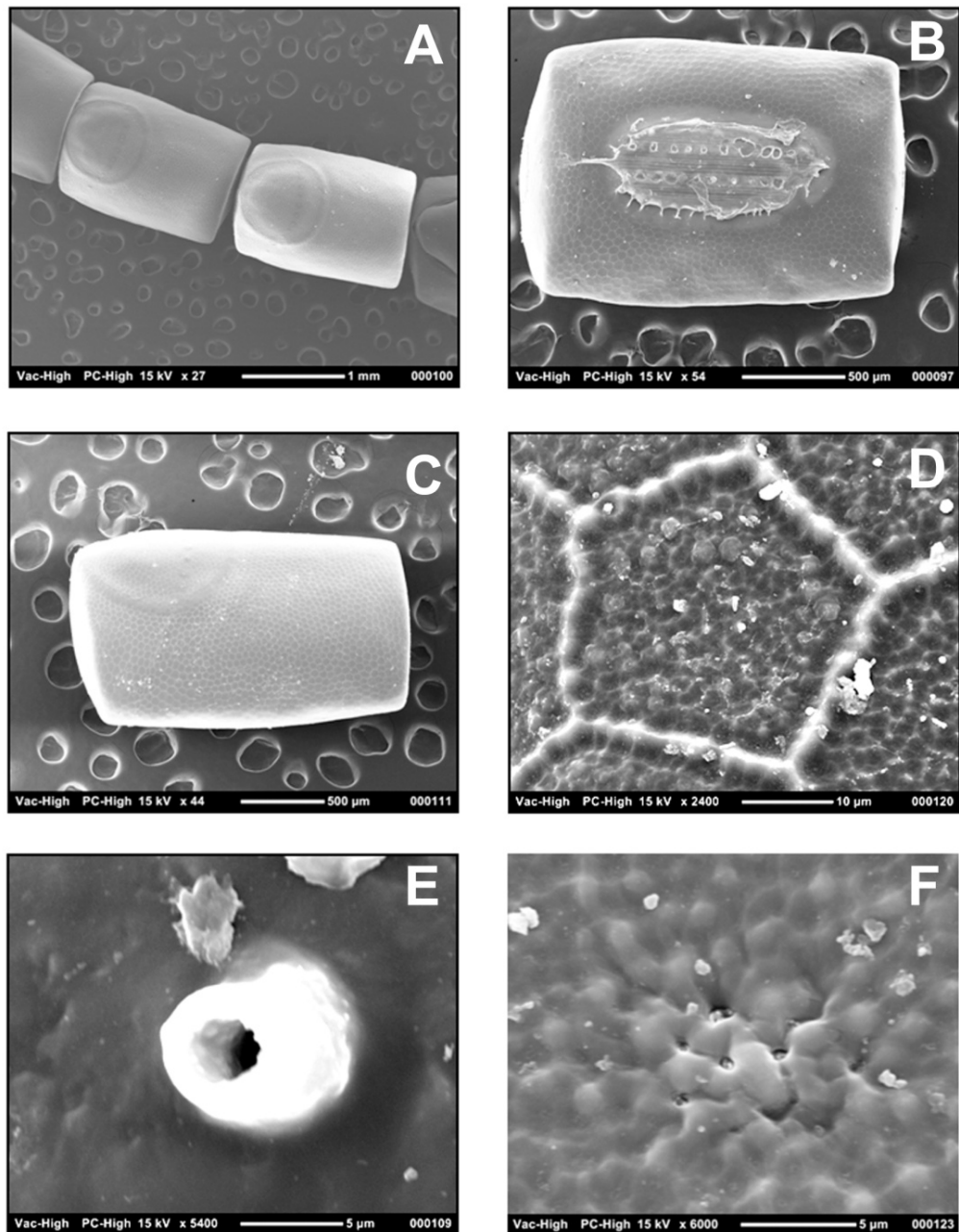


Figura 6 – Fotografie al Microscopio Elettronico a Scansione delle uova di *Leptoglossus occidentalis*: A) Porzione di ovatura distaccata dal supporto in cui sono evidenti gli pseudopercoli circolari posti sulla porzione dorsale in prossimità dell'estremità di ciascun uovo diretta verso la base dell'ago. B) Visione ventrale di un uovo per evidenziare la goccia di secreto, con l'impronta delle righe stomatifere, con cui la femmina del Coreide fissa le uova all'ago. C) Visione laterale in cui è evidente la distribuzione a raggiera della corona di areopili. D) Dettaglio della microscultura del corion a celle pentagonali. E) Particolare di un areopilo. F) Aperture infossate osservate in alcune zone del corion.

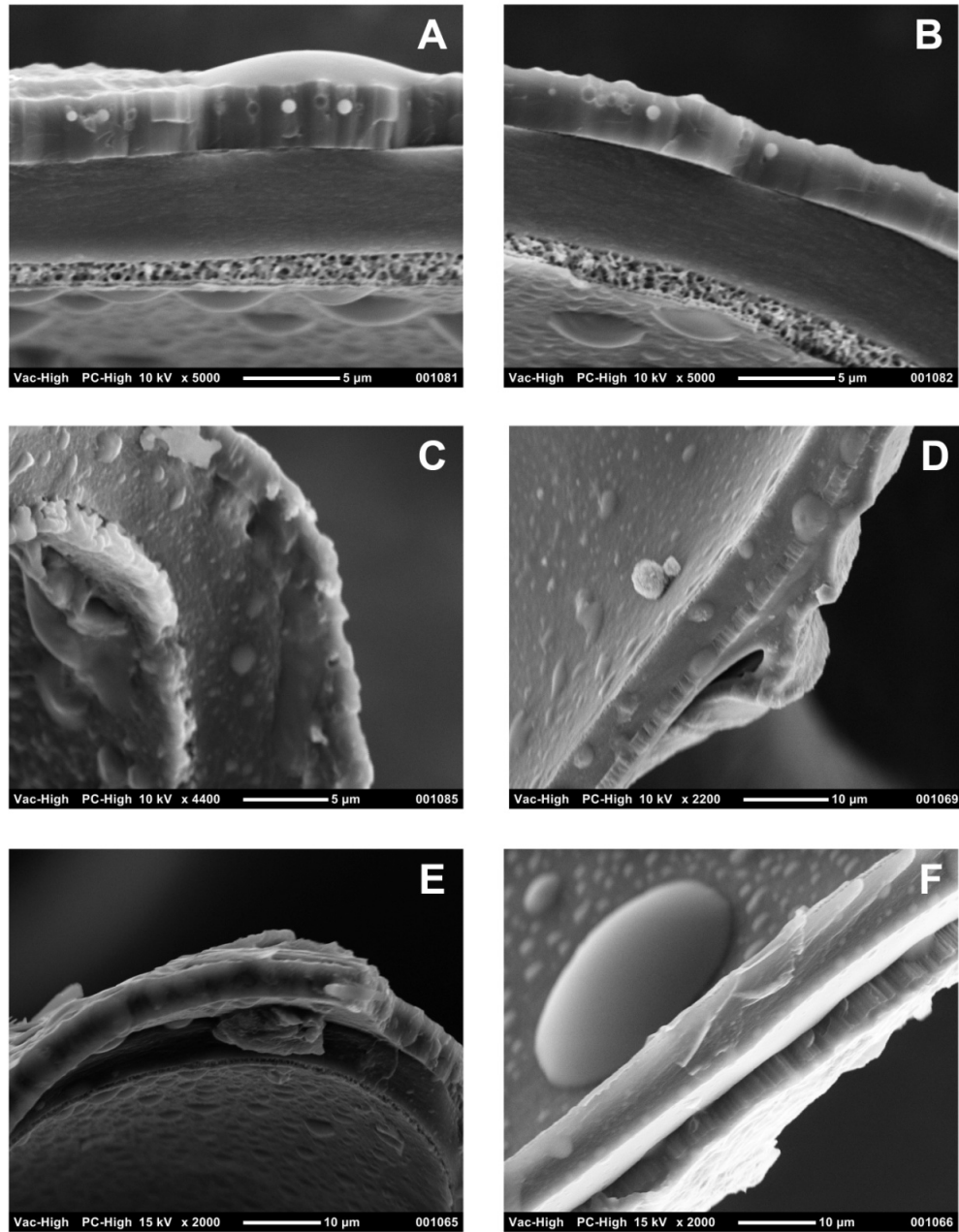


Figura 7 - Fotografie al Microscopio Elettronico a Scansione di uova di *Leptoglossus occidentalis* in cui si può osservare la compattezza del mesocorion, la presenza di cavità nell'esocorion sottostanti i tubercoli degli areopili e la struttura particolarmente elaborata dell'endocorion.

Permeabilità delle uova di *L. occidentalis*.

Il trattamento con soluzione alcolica al 5% di cristalvioletto in etanolo per 30 minuti alla temperatura di 25°C di uova di *L. occidentalis* deposte da non più di 12 ore, ha determinato una colorazione irregolare di gran parte del corion, con esclusione del solo bordo dello pseudopercolo (figura, 8 A). La penetrazione del colorante all'interno dell'esocorion è rilevabile con chiarezza nel particolare della porzione centrale del lato superiore dell'uovo di figura 8 B, acquisita tramite steromicroscopio, dove si può osservare la modalità di distribuzione della soluzione di cristalvioletto, evidenziata dalla colorazione a macchie puntiformi più scure. Zone più ampie di maggiore penetrazione del colorante, con contorno irregolare, sono state inoltre rilevate nella porzione distale dell'uovo opposta al lato in cui è presente l'opercolo (fig. 8 A).

La soluzione acquosa al 2% di blu di toluidina, al contrario, ha colorato in blu in modo netto le camere sottostanti l'intera corona circolare di areopili, con interessamento anche di quelli posti sul lato ventrale dell'uovo, che in nessuno dei casi esaminati sono risultati coperti dal secreto adesivo (figg. 8 C e D). Dopo il trattamento con blu di toluidine, in prossimità dell'estremità anteriore delle uova è stato possibile osservare in corrispondenza dei gruppi di aperture infossate zone limitate di colorazione rossastra determinate da un viraggio metacromatico del colorante in ambiente acido (fig. 8 E).

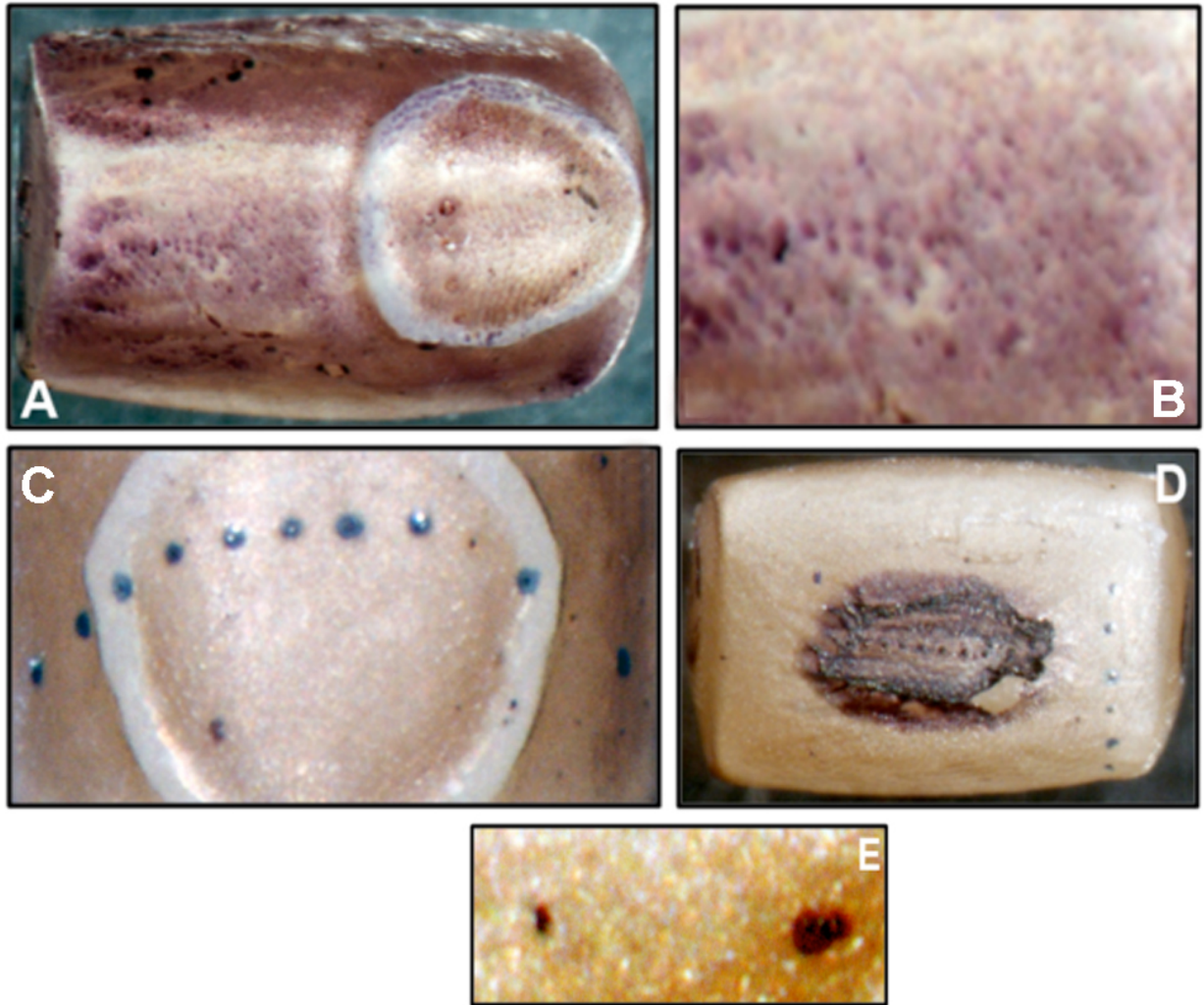


Figura 8 – Uova di *Leptoglossus occidentalis* trattate con coloranti per valutarne la permeabilità: A) Uovo colorato con soluzione alcolica di cristalvioletto al 5%; B) Particolare della superficie della parte centrale della porzione superiore dell'uovo dell'immagine precedente; C) Colorazione con blu di toluidina delle camere sottostanti gli areopili disposti sullo pseudopercolo; D) Visione ventrale di un uovo in cui è evidente la colorazione regolare con blu di toluidina anche degli areopili posti sulla base a contatto dell'ago; E) aperture infossate di colorazione rossastra.

L'immersione in eptano di uova di *L. occidentalis*, contenenti fasi iniziali dello sviluppo, ha fatto rilevare una sopravvivenza degli embrioni dell'eterottero superiore al 90% anche con tempi di immersione pari a 30 minuti, superiori già dopo un intervallo di 600 secondi ai valori ottenuti nella prova con utilizzo di solo tampone fosfato salino non tossico (PBS) (fig. 9).

Le ulteriori prove di immersione in eptano al 99,9%, condotte con uova di *L. occidentalis* appena deposte e con uova di 1, 2 e 3 ore hanno dato risultati simili, senza evidenziare una differente permeabilità del corion prima del suo indurimento (fig. 10).

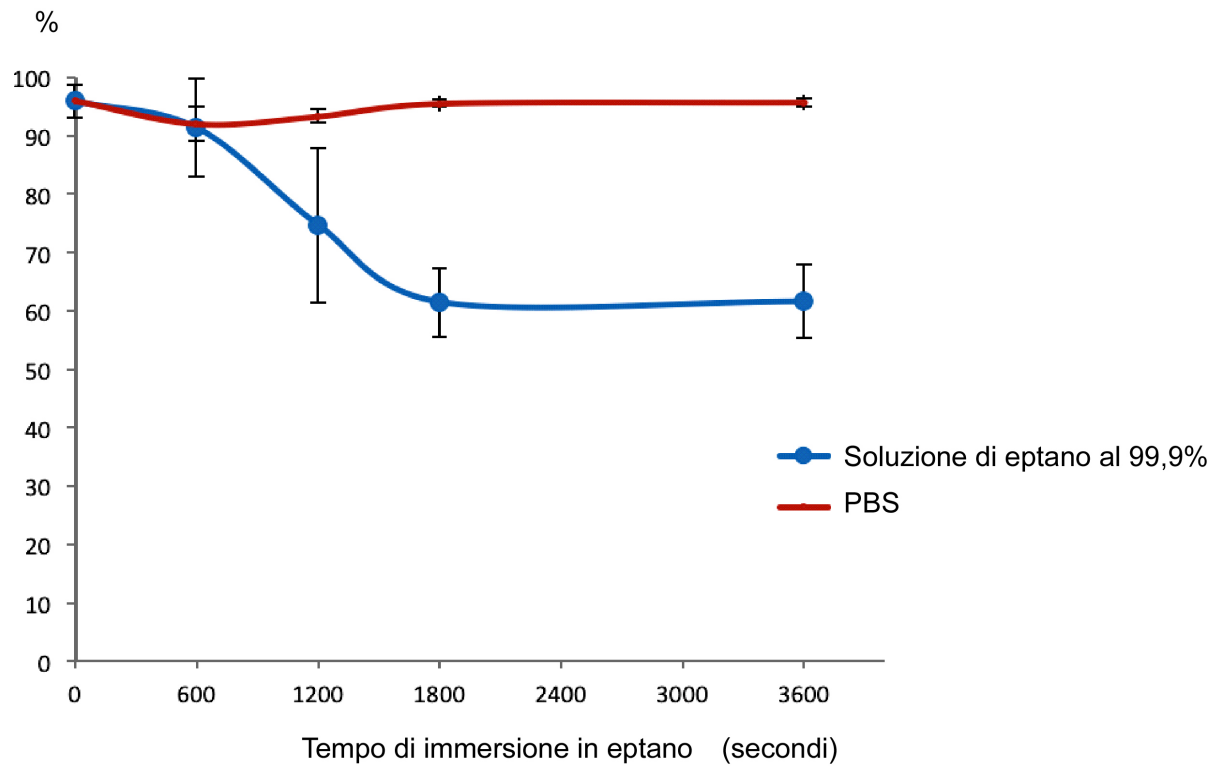


Figura 9 – Percentuali di schiusura di uova di *Leptoglossus occidentalis* deposte da 10 -12 ore immerse in una soluzione di eptano al 99,9% e in PBS per 10, 20, 30 e 60 minuti. Le barre verticali indicano l'Errore Standard.

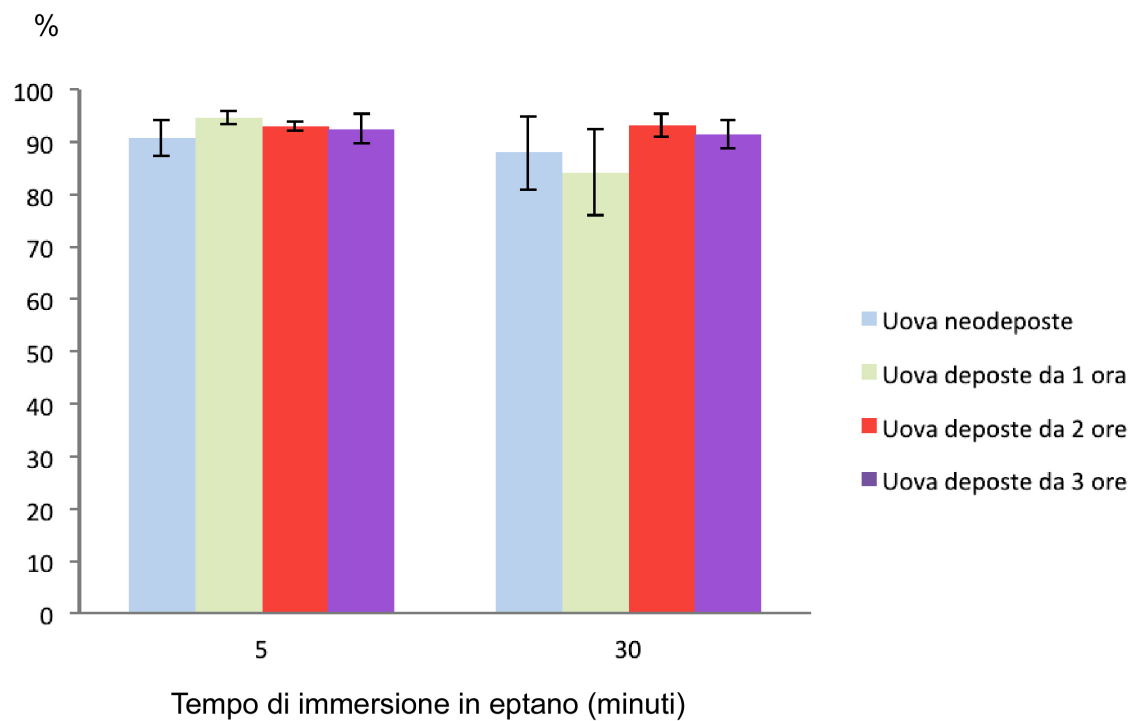


Figura 10 – Percentuali di schiusura di uova di *Leptoglossus occidentalis* deposte da 0 -3 ore immerse in una soluzione di eptano al 99,9% per 5 e 30 minuti. Le barre verticali indicano l'Errore Standard.

Decorionizzazione delle uova di *Galleria mellonella* parassitizzate da *Trichogramma brassicae*

T. brassicae è risultato capace di svilupparsi in uova di *G. mellonella* trattate con una soluzione di ipoclorito di sodio al 4% + Tween 80, usando il protocollo sviluppato da Cosi *et al.* (2010) per il trattamento delle uova dell'ospite. Una percentuale dei parassitoidi pari al $19\% \pm 12$ del totale uova parassitizzate ha infatti completato lo sviluppo in uova decorionate ed è regolarmente sfarfallato. Il numero di *T. brassicae* sfarfallati dalle uova decorionate è risultato però significativamente inferiore agli sfarfallamenti registrati nel testimone ($P < 0,05$). E' stata inoltre rilevata tra le ovature trattate in freezer una maggiore variabilità nella percentuale di *Trichogramma* regolarmente sfarfallati, rispetto alle ovature di controllo.

L'esame della distribuzione percentuale dei Tricogrammi morti all'interno delle uova ospiti nei diversi stadi di sviluppo (larve, prepupe, pupe, adulti), rilevabile in figura 12, evidenzia come nel caso del testimone gran parte degli esemplari siano morti nelle prime fasi, come larve, stadio in cui è stata rilevata una mortalità dell' $87\% \pm 4$, mentre solo il $13,5\% \pm 5$ ha fatto registrare l'arresto di sviluppo come prepupa. Nelle condizioni testate, nelle uova del testimone non sono stati riscontrate pupe o adulti dell'ooparassitoide morti all'interno delle uova.

Differente distribuzione è stata rilevata nelle uova decorionate, nelle quali una quota non significativamente diversa di Tricogrammi è morta come larva e prepupa con una leggera preponderanza del secondo stadio (larve $38\% \pm 9$ ES, prepupe $41\% \pm 16$ ES), seguita da una percentuale del 21 ± 7 ES di esemplari morti come pupa completamente formata. Non sono stati osservati durante la dissezione delle uova di *Galleria* adulti farati dell'ooparassitoide deceduti all'interno delle uova (fig. 12).

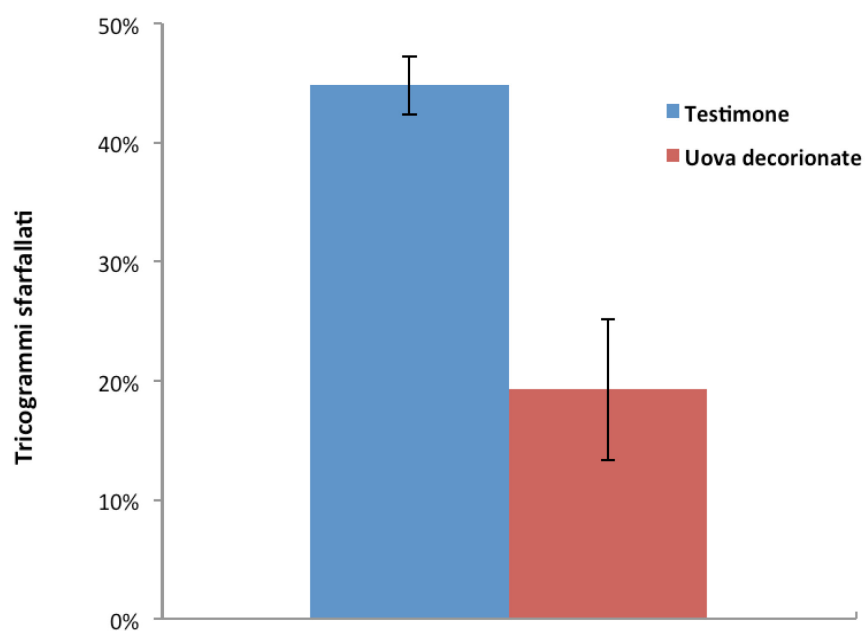


Figura 11 - Percentuale di adulti di *Tricogramma brassicae* sfarfallati da uova non trattate e da uova sottoposte a trattamento di decorionizzazione e permeabilizzazione con ipoclorito di sodio e Tween 80. Le barre verticali indicano l'errore standard.

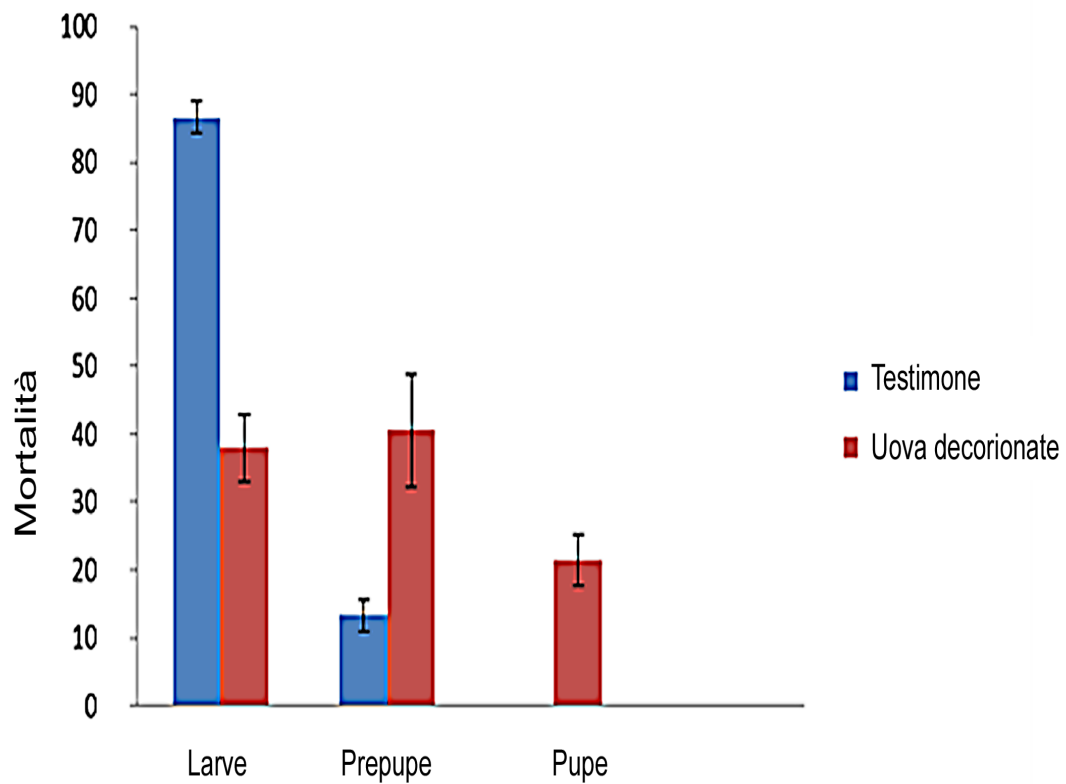


Figura 12 - Distribuzione percentuale della mortalità di *Tricogramma brassicae* nei diversi stadi di sviluppo, in uova di *Galleria mellonella* non trattate e in uova decorionate dopo la parassitizzazione. Le barre verticali sono riferite all'errore standard.



Figura 13 – Ovatura di *Galleria mellonella* posta in freezer a -20°C per 3 ore, parassitizzata da *Tricogramma brassicae*, fotografata dopo lo sfarfallamento degli adulti dell'ooparassitoide.



Figura 14 – Particolare di un ovatura decorionata e permeabilizzata di *Galleria mellonella* fotografata dopo lo sfarfallamento degli adulti di *Trichogramma brassicae*: si possono osservare corion con il foro di sfarfallamento dei parassitoidi in posizione eccentrica e uova dell'ospite contenenti pupe dell'oofago a diverso stadio di sviluppo.

Introduzione dei crioprotettivi nelle uova parassitizzate di *Galleria mellonella*

A fronte dei discreti valori di sopravvivenza dell'ooparassitoide riscontrati nei test di permeabilità, le prove effettuate per indagare l'applicabilità a *T. brassicae* del protocollo utilizzato per l'introduzione di crioprotettivi e la successiva disidratazione e concentrazione di etilenglicole nelle uova contenenti embrioni vitali di *G. mellonella*, hanno fatto registrare esito negativo. Da nessuna delle ovature utilizzate nelle prove sono sfarfallati adulti del tricogrammatide ed è stata invece rilevata una rapida interruzione dello sviluppo del parassitoide, del quale sono stati rinvenuti all'interno delle uova ospiti solo larve morte (fig. 15).

Le prove parallele realizzate mediante trattamento con PBS senza crioprotettivi per una durata complessiva analoga (1,5 ore), effettuate per verificare l'influenza della sola immersione sugli embrioni di Tricogramma all'interno di uova decorionate, pur mostrando una differente distribuzione nei diversi stadi biologici hanno fatto registrare anch'esse la mortalità di tutti i parassitoidi all'interno delle uova di Galleria. Quanto sopra indipendentemente dall'esposizione o meno per 30 minuti alla temperatura di 0°C, tanto che per nessuno degli stadi biologici presi in considerazione sono state rilevate differenze significative tra i due gruppi di ovature trattate con solo PBS. Da rilevare che successivamente al trattamento con PBS parte dei parassitoidi hanno completato lo sviluppo e sono stati infatti rinvenuti come adulti morti all'interno dei corion del lepidottero: $3\% \pm 3$ nelle uova trattate con PBS a temperatura ambiente e $4\% \pm 3$ nelle uova sottoposte anche ad un successivo passaggio in PBS a 0°C.

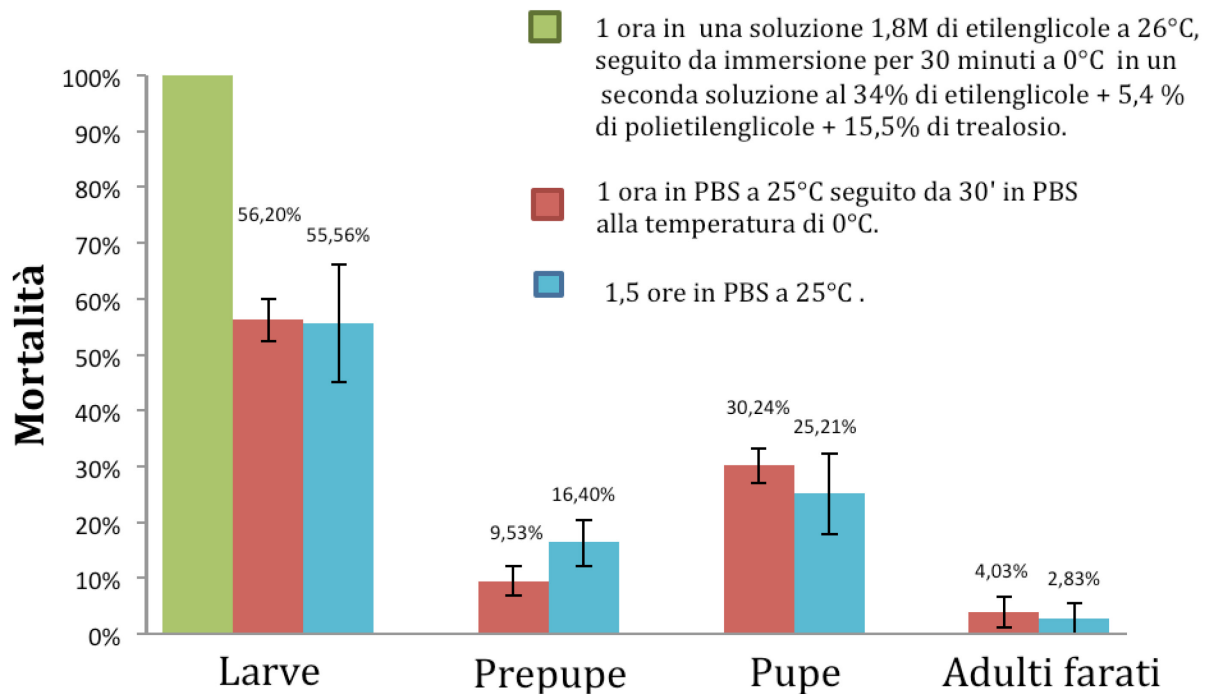


Figura 15 - Distribuzione percentuale della mortalità del parassitoide *Trichogramma brassicae* nei differenti stadi di sviluppo, dopo l'introduzione di crioprotettivi nelle uova di *Galleria mellonella*. Le barre verticali sono riferite all'errore standard.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Lo stoccaggio a basse e ultrabasse temperature di uova, larve e pupe di insetti fitofagi, principalmente ma non solo per garantire una elevata disponibilità di substrati alimentari e riproduttivi nelle biofabbriche, è stato oggetto di vari studi per ovviare a problematiche logistiche e di decadimento della qualità delle popolazioni soggette a cicli continui in ambiente controllato (van Lenteren e Tommasini, 2003; Leopold, 2007).

In vari casi le indagini hanno riguardato ospiti utilizzati per l'allevamento di ooparassitoidi inclusi tra gli Hymenoptera Platygastroidea, superfamiglia che annovera un elevato numero di specie (Masner, 1976) utilizzate in programmi di controllo biologico classico e di tipo inondativo (Bin, 1994). Le ricerche finora effettuate su ooparassitoidi e loro ospiti hanno messo in luce l'importanza di test sperimentali per la messa a punto di specifici protocolli per ciascun binomio vittima - oofago, in relazione sia alle temperature utilizzabili che ai tempi di conservazione delle uova prima dell'esposizione all'entomofago (Gautam R.D., 1987; Leopold, 1998; Kivan e Kilic, 2005; Chen e Leopold, 2007; Mahmoud e Lim, 2007).

I risultati ottenuti nelle indagini svolte nell'ambito della presente Tesi di Dottorato hanno evidenziato che le uova del Coreide *Leptoglossus occidentalis* Heidemann possono essere conservate a freddo con tecniche di stoccaggio a lungo termine per periodi di tempo fino a 6 mesi e successivamente utilizzate per l'allevamento dell'ooparassitoide *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead), con percentuali di sfarfallamento dell'oofago prossime all'80%. Nello specifico è stata evidenziata, analogamente a studi condotti sulla specie congenere *Gryon japonicum* (Ashmead) (Alim e Lim, 2009), la possibilità di conservazione in frigo ad una temperatura superiore a 0°C fino ad un tempo massimo di 3 mesi. I dati ottenuti concordano con precedenti studi

anche per quanto attiene la criticità dell'impiego di congelatori con temperatura di -20°C (Greco e Stilinovic, 1998), valore al quale si è registrato un rapido crollo delle percentuali di sfarfallamento di *G. pennsylvanicum* già a partire da 1 mese di stoccaggio. Risultano inoltre coerenti con le attuali conoscenze i dati di sfarfallamento di *G. pennsylvanicum* da uova dell'ospite stoccate per -80°C e -140°C . In particolare per la temperatura criogenica di -140°C , per la prima volta utilizzata a livello mondiale in test per verificare le possibilità di stoccaggio di uova ospiti di Imenotteri ooparassitoidi, il mantenimento di valori costantemente alti e non diversi dal controllo per tutti i periodi di stoccaggio testati concorda con le attuali conoscenze sulle positive ricadute di una rapida discesa termica e dell'impiego di temperature inferiori a -130°C (Roversi *et al.*, 2008). La discendenza degli adulti di *G. pennsylvanicum* ottenuti dalle uova stoccate alle differenti temperature basse e ultrabasse, allevata su uova neodeposte di *L. occidentalis* in condizioni standard a 26°C , non ha fatto registrare nessuna differenza significativa negli sfarfallamenti, evidenziando come per le prove condotte da Chen e Leopold (2007) con il Mymaridae *Gonatocerus ashmeadi* Girault la non estensione degli effetti rilevati nella prima generazione. Per quanto attiene la sex-ratio non sono emerse differenze di rilievo in nessuna delle due generazioni di *G. pennsylvanicum* per nessuna delle temperature di stoccaggio considerate.

Il corion, struttura stratificata che riveste le uova degli insetti, principalmente composto di proteine formate durante l'oogenesi (Miya, 1984), presenta un architettura generale che permette uno stretto controllo degli scambi gassosi, minimizza le perdite di acqua, impedisce la penetrazione di microrganismi patogeni e agisce come involucro meccanico di protezione per ooplasma ed embrioni (Hinton, 1962, 1967, 1969, 1970, 1981; Yamashita e Hasegawa, 1985). Possono inoltre essere presenti ulteriori strati di

sostanze diverse, ad esempio cere o secreti di particolari ghiandole presenti nelle femmine ovideponenti, che contribuiscono ad aumentare le selettività degli scambi. L'isolamento dell'uovo rispetto all'ambiente esterno può risultare talmente spinto da impedire quasi totalmente gli scambi gassosi, tanto che eventuali ooparassitoidi presenti all'interno, a seguito del protrarsi del loro sviluppo su di un arco di tempo più lungo di quello sufficiente alla vittima, hanno evoluto elaborate modifiche morfologiche delle mandibole delle larve per perforare il corion dell'ospite e consentire l'ingresso di una quantità di ossigeno sufficiente a permettere loro di completare lo sviluppo (Bin *et al.*, 2000).

Per permettere l'applicazione di protocolli di crioconservazione agli insetti, le uova devono essere permeabili all'acqua ed ai crioprotettivi, poiché le procedure di vitrificazione richiedono la rimozione di parte del contenuto in acqua e l'introduzione di tali sostanze, nonché, data la concentrazione e conseguente tossicità, la successiva rimozione dei crioprotettivi durante la fase di rapido riscaldamento finale cui devono essere sottoposti gli organismi al termine dello stoccaggio.

Per quanto attiene gli studi preliminari sulle potenzialità di crioconservazione di uova del Coreide per lo stoccaggio del suo antagonista naturale, i dati ottenuti con coloranti, corroborati dalle indagini effettuate tramite microscopia a scansione, hanno mostrato che il corion di *L. occidentalis* ha una struttura in grado di isolare efficacemente l'embrione in via di sviluppo dall'ambiente esterno. Le indagini svolte mediante immersione di uova di *L. occidentalis* di diversa età in eptano al 99,9%, soluzione altamente tossica, hanno infatti evidenziato la capacità di queste uova di completare lo sviluppo anche dopo 30 minuti di permanenza in questo alcano, grazie ad un livello di permeabilità estremamente basso.

In merito ai test effettuati con le uova di *Galleria mellonella* (L.) parassitizzate dal Trichogrammatidae *Trichogramma brassicae* (Bezdenko), le prove condotte hanno permesso di ottenere adulti dell'ooparassitoide da uova dell'ospite permeabilizzate con i trattamenti di "decorionizzazione" a base di ipoclorito di sodio e Tween80, già testati con risultati positivi per embrioni vitali del Lepidottero (Cosi *et al.*, 2010). Nessun adulto di *Trichogramma* è invece sfarfallato dalle uova ospiti dopo il successivo caricamento dei crioprotettivi, evidenziando un effetto tossico che ha portato alla morte delle larve dell'ooparassitoide, di cui si è potuto rilevare, mediante controllo del contenuto delle uova ospiti, un repentino blocco dello sviluppo. Quanto rilevato ha posto le premesse per ulteriori test con miscele di crioprotettivi in grado determinare effetti sinergici anche a maggiori diluizioni e permettere i successivi passaggi di vitrificazione contenendo nel contempo gli effetti tossici determinati dall'utilizzo di queste sostanze nelle elevate concentrazioni richieste dai passaggi di crioconservazione.

RINGRAZIAMENTI

La prima persona che vorrei ringraziare è Stefania, lei più di tutti mi è stata vicino in questi anni e mi ha sempre sostenuto nei momenti negativi. Voglio condividere questo traguardo con te, grazie.

Un ringraziamento va a mio padre Francesco, a mia madre Franca ed a mia sorella Wanda, che hanno creduto in me e mi hanno permesso di arrivare sin qui

Ringrazio le amiche di lunga data, Simona e Mariangela per la stima che avete di me.

Inoltre vorrei ringraziare i miei amici, colleghi e coinquilini Manuela, Giada, Muhamad e Mabrouk per l'aiuto ed il supporto morale.

Vorrei ringraziare il Prof. Pio Federico Roversi per l'aiuto, e la disponibilità che mi ha mostrato in tante occasioni durante questi anni.

Un ringraziamento speciale va anche al Dott. Sabbatini Peverieri ed al Dott. Sauro Simoni per l'aiuto e la disponibilità. Vi ringrazio.

Un sincero ringraziamento va anche a tutto il personale di ruolo, precario ed in pensione dell'Istituto di Ricerca presso cui ho svolto il dottorato. In particolare vorrei ringraziare Tina, Paola, Donatella, Franca, Elena, Silvia e Luciano impegnandomi a non incupire più la sala mensa. Grazie.

Ringrazio infine il Dott. Lambardi per la revisione critica del manoscritto ed il Prof. Pennacchio per avermi dato l'opportunità di lavorare a Firenze.

BIBLIOGRAFIA

- ALIM, M. A., and U. T. LIM, 2009 Refrigeration of *Riptortus clavatus* (Hemiptera: Alydidae) eggs for the parasitization by *Gryon japonicum* (Hymenoptera: Scelionidae). *Biocontrol Science and Technology* **19**: 315-325.
- ALIM, M. A., and U. T. LIM, 2010 Biological attributes of *Ooencyrtus nezarae* Ishii (Hymenoptera: Encyrtidae) reared on refrigerated eggs of *Riptortus pedestris* (= *clavatus*) Fabricius (Hemiptera: Alydidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* **13**: 139-143.
- BATES, S. L., and J. H. BORDEN, 2004 Parasitoids of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) in British Columbia. *Journal of the Entomological Society of British Columbia* **101**: 143-144.
- BATES, S. L., and J. H. BORDEN, 2005 Life table for *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) and prediction of damage in lodgepole pine seed orchards. *Agricultural and forest entomology* **7**: 145-151.
- BATTISTI A., IANNE P., MILANI N., ZANATA M., 1990 – Preliminary accounts on the rearing of *Ooencyrtus pityocampae* (Mercet) (Hym., Encyrtidae). – *Journal of Applied Entomology*, 110(5): 121-127.
- BERNARDINELLI, I., and P. ZANDIGIACOMO, 2001 *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera, Coreidae): a conifer seed bug recently found in northern Italy. *Journal of Forest Science* **47**: 56-58.
- BIN F., 1994 – Biological control with egg parasitoids other than *Trichogramma*. In: *Biological control with egg parasitoids*. eds. E.A. Wajnberg e S.A. Hassan, CAB International : 145-153.
- BIN F., ROVERSI P.F., MEIERROSE C., ISIDORO N., ROMANI R., 2000 – Ventilation holes in host egg shell: a parasitoid adaptation to a host constraint. *Proceedings Antonie van Leeuwenhoek Symposium. 7th European Workshop on Insect Parasitoids. 1-6 October 2000, Haarlem, The Netherlands*: 37.
- BOIVIN, G., 1994 Overwintering strategies of egg parasitoids, pp. 219–244 in *Biological control with egg parasitoids*, edited by E. WAJNBERG and S. A. HASSAN. CAB international, Wallingford.
- BOUCHAUD, J. P., and M. MÉZARD, 1994 Self induced quenched disorder: a model for the glass transition. *J. Phys. I France* **4**: 1109-1114.

- BOUTRON, P., and A. KAUFMANN, 1979 Stability of the amorphous state in the system water—1,2-Propanediol. *Cryobiology* **16**: 557-568.
- BOUTRON, P., P. MEHL, A. KAUFMANN and P. ANGIBAUD, 1986 Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons. I. Binary systems water-polyalcohol. *Cryobiology* **23**: 453-469.
- BRANDEN, C., and J. TOOZE, 1991 *Introduction to protein structure*. Garland New York.
- CANTO-SILVA, C. R., H. P. ROMANOWSKI and L. R. REDAELLI, 2006 Reproductive parameters and longevity of *Gryon gallardoi* (Brethes) (Hymenoptera: Scelionidae) parasitizing *Spartocera dentiventris* (Berg) (Hemiptera: Coreidae) eggs. *Braz J Biol* **66**: 19-24.
- CHEN, W.-L., and R. A. LEOPOLD, 2007 Progeny Quality of *Gonatocerus ashmeadi* (Hymenoptera: Mymaridae) Reared on Stored Eggs of *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology* **100**: 685-694.
- CONSOLI F.L., PARRA J.R.P., 1999 – In vitro rearing of parasitoids: constraints and perspectives. – *Trends in Entomology*, 2: 19-32.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S., and M. C. N. D. OLIVEIRA, 1998 Viability of *Nezara viridula* (L.) eggs for parasitism by *Trissolcus basalis* (Woll.), under different storage techniques in liquid nitrogen. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* **27**: 101-107.
- COSI, E., M. T. ABIDALLA and P. F. ROVERSI, 2010 The effect of Tween 80 on eggshell permeabilization in *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera, Pyralidae). *Cryoletters* **31**: 291-300.
- DANKS, H. V., 1987 Insect dormancy: an ecological perspective. *Biological Survey of Canada (Terrestrial Artropods)*.
- DANKS, H. V., O. KUKAL and R. A. RING, 1994 Insect Cold-Hardiness: Insights from the Arctic.
- DASILAO, A. O., and R. ARAKAWA, 2004 Reproductive capacity and host handling behavior of *Gryon philippinense* (Ashmead)(Hymenoptera: Scelionidae), a solitary egg parasitoid of the winter cherry bug, *Acanthocoris sordidus* Thunberg (Hemiptera: Coreidae). *Applied entomology and zoology* **39**: 263-269.
- DONTH, E., 2001 *The glass transition: relaxation dynamics in liquids and disordered materials*. Springer.

- ECHLIN, P., 1991 Ice crystal damage and radiation effects in relation to microscopy and analysis at low temperatures. *Journal of Microscopy* **161**: 159-170.
- FAHY, G., 1995 The role of nucleation in cryopreservation, pp. 315-336 in *Biological Ice Nucleation and its Applications* edited by R. E. LEE, G. J. J. WARREN and L. V. GUSTA. APS Press, St. Paul.
- FAHY, G. M., B. WOWK, J. WU and S. PAYNTER, 2004 Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology* **48**: 22-35.
- FENT, M., and P. KMENT, 2011 First record of the invasive western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Turkey. *North-Western Journal of Zoology* **7**: 72-80.
- FICK, A., 1855 On Liquid Diffusion *Phil. Mag. and Jour. Sci.* **10**: 31-39.
- FOLMER, O., M. BLACK, W. HOEH, R. LUTZ and R. VRIJENHOEK, 1994 DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* **3**: 294-299.
- FRANKS, F., and M. C. R. SYMONS, 1977 Solvation and Conformational Effects in Aqueous Solutions of Biopolymer Analogues [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* **278**: 33-57.
- FULLER, B. J., N. LANE and E. E. BENSON, 2004 - *Life in the frozen state*. CRC Press: 672 pp.
- GALL, W., 1992 Further eastern range extension and host records for *Leptoglossus accidentalis* (Heteroptera: Coreidae): Well-documented dispersal of a household nuisance. *Great Lakes Entomologist* **25**: 159.
- GAUTAM R.D., 1987 – Cold storage of eggs of host, *Spodoptera litura* (Fabr.) and its effects on parasitism by *Telenomus remus* Nixon (Scelionidae: Hymenoptera). – *Journal of Entomological Research*, 11: 161-165.
- GENDUSO, P., 1978 Crioconservazione di uova di Eterotteri in azoto liquido per l'allevamento di parassitoidi oofagi, pp. 365-370 in *XI Congresso Nazionale Italiano di Entomologia*. F. Giannini & figli, Portici.
- GRECO, C. F., and D. STILINOVIC, 1998 Parasitization performance of *Trichogramma* spp. (Hym., Trichogrammatidae) reared on eggs of *Sitotroga cerealella* Oliver (Lep., Gelechiidae), stored at freezing and subfreezing conditions. *Journal of Applied Entomology* **122**: 311-314.

- GRENIER S., 1997 – State of art in artificial rearing of parasitoid insects, especially oophagous species. – Boln. Asoc. esp. Ent. , Supl. 21: 61-62.
- GRENIER S., DE CLERCQ P., 2003 – Comparison of artificial vs. naturally reared natural enemies and their potential for use in biological control. In: Quality control and production of biological control agents. Theory and testing procedures. ed. J.C. van Lenteren, CAB International: 115-131.
- GROUT, B. W. W., and G. MORRIS, 1987 The effects of low temperatures on biological systems. Edward Arnold London,, UK.
- GUANG-HONG, L. I., P. YI, C. QI-JIN and S. U. ZHI-JIAN, 2001 Cryopreservation of the beet armyworm eggs. *Insect Science* **8**: 124-130.
- HEACOX A., LEOPOLD R.A., BRAMMER J.D., 1985 – Survival of house fly embryos cooled in the presence of dymethylsulfoxide. – *Cryo-Letters*, 6: 305-312.
- HEIDEMANN, O., 1910 New species of *Leptoglossus occidentalis* from North America (Hemiptera; Coreidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* **12**: 191-197.
- HINTON H.E., 1962 – Respiratory systems of insect egg-shells. – *Sci. Prog.*, 50:96-113..
- HINTON H.E., 1967 – The respiratory system of the egg-shell of the common housefly. - *Journal of Insect Physiology*, 13: 647-651.
- HINTON H.E., 1969 – Respiratory systems of insect egg shells. - *Annual review of Entomology*, 14: 343-368.
- HINTON H.E., 1970 – Insect eggshells. - *Scientific American*, 223: 84-91.
- HINTON H.E., 1981 – Biology of insect eggs. vol. I, Pergamon press, Oxford. XXIV+473.
- HIRSCHFELDER, J. O., C. F. CURTISS and R. B. BIRD, 1954 Molecular theory of gases and liquids. Wiley New York.
- HUAI-YI, M., 1988 - Studies on long-term storage of hosts for propagating *Trichogramma*. *Colloques de l'INRA*.
- IRDANI T., SCOTTO C., ROVERSI P.F., 2011 – Low cryoprotectant concentrations and fast cooling for nematode cryostorage. – *Cryobiology* 63: 12-16.
- KANDEL, E. R., J. H. SCHWARTZ and T. M. JESSELL, 2000 - Principles of neural science. McGraw-Hill New York.

- KIVAN, M., and N. KILIC, 2005 - Effects of storage at low-temperature of various heteropteran host eggs on the egg parasitoid, *Trissolcus semistriatus*. *BioControl* **50**: 589-600.
- KUKAL, O., M. P. AYRES and J. M. SCRIBER, 1991 Cold tolerance of the pupae in relation to the distribution of swallowtail butterflies. *Canadian Journal of Zoology* **69**: 3028-3037.
- KUKAL, O., A. SERIANNI and J. DUMAN, 1988 Glycerol metabolism in a freeze-tolerant arctic insect: an in vivo ^{13}C NMR study. *Journal of Comparative Physiology B* **158**: 175-183.
- LASALLE J., GAULD I.D., 1993 – Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. In: *Hymenoptera and Biodiversity*. Eds. J. LaSalle e I.D. Gauls, CAB International: 1-26.
- LEOPOLD R.A., 1991 – Cryopreservation of insect germoplasm: cells, tissues and organisms. In: *Insects at low temperature*. eds. R.E. Lee e D.L. Denlinger, Chapman & Hall, New York, NY: 379-407.
- LEOPOLD, R. A., 1998 Cold storage of insects for integrated pest management. In: *Temperature sensitivity in insects and application in integrated pest management*. eds. G. J. Hallman and D. L. Denlinger. West view Press, Boulder, CO: 235-267.
- LEOPOLD R.A., 2007 – Colony Maintenance and Mass-Rearing: Using Cold Storage technology for Extending the Shelf-Life of Insects. In: *Area-Wide Control of Insect Pests*. eds. M.J.B. Vreysen, A.S. Robinson e J. Hendrich: 149-162.
- LEOPOLD, R. A., and P. W. ATKINSON, 1999 Cryopreservation of sheep blow fly embryos, *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *Cryo-letters* **20**: 37-44.
- LEOPOLD, R. A., A. RAJAMOHAN, T. E. SHELLY and A. M. HANDLER, 2010 Quality Testing of Three Species of Tephritid Fruit Flies After Embryo Cryopreservation. *Annals of the Entomological Society of America* **103**: 264-272.
- LEOPOLD, R. A., W. B. WANG, D. R. BERKEBILE and T. P. FREEMAN, 2001 Cryopreservation of embryos of the New World screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Annals of the Entomological Society of America* **94**: 695-701.
- LEUTHEUSSER, E., 1984 Dynamical model of the liquid-glass transition. *Physical Review A* **29**: 2765-2773.

- LI, L.-Y., 1994 - Worldwide Use of *Trichogramma* for Biological control on different Crop: a Survey. In: Biological control with egg parasitoids. eds. E.A. Wajnberg e S.A. Hassan, CAB International : 37-53.
- LI, Z.-Y., Y.-B. XUE, Z. WANG and X.-A. LI, 2010 Cryopreservation of Queen Honeybee (*Apis mellifera carnica*) Born Worker Eggs by Vitrification. Agricultural Sciences in China **9**: 1353-1361.
- LIU Z.C., LIU J.F., WANG C.X., YANG W.H., LI D.S., 1995 – Mechanized production of artificial eggs for mass rearing of parasitic wasps. – Coll. INRA “*Trichogramma* and other egg parasitoids”, 43: 163-164.
- MACFARLANE, D. R., 1987 Physical aspects of vitrification in aqueous solutions. Cryobiology **24**: 181-195.
- MACKENZIE, A., W. DERBYSHIRE, D. REID, A. MACKENZIE, W. DERBYSHIRE *et al.*, 1977 Non-Equilibrium Freezing Behaviour of Aqueous Systems [and Discussion]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences **278**: 167-189.
- MAHMOUD, A. M. A., and U. T. LIM, 2007 Evaluation of cold-stored eggs of *Dolycoris baccarum* (Hemiptera: Pentatomidae) for parasitization by *Trissolcus nigripedius* (Hymenoptera: Scelionidae). Biological Control **43**: 287-293.
- MALTESE, M., V. CALECA, E. GUERRIERI and W. B. STRONG, 2012 Parasitoids of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) recovered in western North America and first record of its egg parasitoid *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead) (Hymenoptera: Platygasteridae) in California. Pan-Pacific Entomologist **88**: 347-355.
- MASNER L., 1976 – Revisionary notes and keys to world genera of Scelionidae (Hymenoptera: Proctotrupoidea). – Memoirs of the Entomological Society of Canada, 97: 1-87.
- MASUTTI L., BATTISTI A., MILANI N., ZANATA M., ZANAZZO G., 1993 – In vitro rearing of *Ooencyrtus pityocampae* (Hym., Encyrtidae), an egg parasitoid of *Thaumetopoea pityocampa* (Lep., Thaumetopoeidae). – Entomophaga, 38(3): 327-333.
- MAZUR, P., K. W. COLE, J. W. HALL, P. D. SCHREUDERS and A. P. MAHOWALD, 1992a Cryobiological preservation of *Drosophila* embryos. Science **258**: 1932-1935.
- MAZUR, P., K. W. COLE and A. P. MAHOWALD, 1992b Critical factors affecting the permeabilization of *Drosophila* embryos by alkanes. Cryobiology **29**: 210-239.

- MCPHERSON, J., R. PACKAUSKAS, S. TAYLOR and M. O'BRIEN, 1990 Eastern range extension of *Leptoglossus occidentalis* with a key to *Leptoglossus* species of America North of Mexico (Heteroptera: Coreidae). *Great Lakes Entomologist* **23**: 99-104.
- MEHL, P., 1997 Crystallization and vitrification in aqueous glass-forming solutions, pp. 185-255 in *Advances in low-temperature biology*, edited by P. L. STEPONKUS. JAI Press, Greenwich.
- MEHL, P., and P. BOUTRON, 1988 Cryoprotection of red blood cells by 1,3-butanediol and 2,3-butanediol. *Cryobiology* **25**: 44-54.
- MILES J.E., BALE J.S., 1995 – Analysis of chilling injury in the biological control agent *Aphidoletes aphidimyza*. – *Cryobiology*, 32: 436-443.
- MILLER, K., 1982 Cold-hardiness strategies of some adult and immature insects overwintering in interior Alaska. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **73**: 595-604.
- MILLER, L. K., 1978 Physiological studies of arctic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **59**: 327-334.
- MILLER, L. K., and R. WERNER, 1987 Extreme Supercooling as an Overwintering Strategy in Three Species of Willow Gall Insects from Interior Alaska. *Oikos* **49**: 253-260.
- MITCHELL, P., 2000 Leaf-footed bugs (Coreidae). In: *Heteroptera of economic importance*, ed. C. W. SCHAEFER and A. R. PANIZZI. CRC Press, Boca Raton, USA: 337-403.
- MIYA K., 1984 – Early Embryogenesis of *Bombyx mori*. In: *Insect Ultrastructure*, vol.II, eds. R.C. King e H. Akai, Plenum Press, New York: 49-73.
- MONASSON, R., 1995 Structural Glass Transition and the Entropy of the Metastable States. *Physical Review Letters* **75**: 2847-2850.
- MYØS, A. L. F. T., T. R. NIELSEN and F. ØDEGAARD, 2010 The Western Conifer Seed Bug (*Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910)(Hemiptera, Coreidae) found in SW Norway. *Norwegian Journal of Entomology* **57**: 20-22.
- NECHOLS, J. R., J. L. TRACY and E. A. VOGT, 1989 Comparative ecological studies of indigenous egg parasitoids (Hymenoptera: Scelionidae; Encyrtidae) of the squash bug, *Anasa tristis* (Hemiptera: Coreidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*: 177-188.

- NORDLUNG D.A., WU Z.X., GREENBERG S.M., 1997 – In vitro rearing of *Trichogramma minutum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) for ten generations, with quality assessment comparisons of in vitro and in vivo reared adults. – *Biological Control*, 9: 201-207.
- NORTH, A. C. T., 1981 *Water, A comprehensive treatise: Volume 6: Edited by Felix Franks. Pp 495. Plenum press, New York and London. 1979. Headington Hill Hall.*
- NUNAMAKER, R. A., and J. A. LOCKWOOD, 2001 Cryopreservation of Embryos of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology* **38**: 55-58.
- OJOVAN, M. I., and W. E. LEE, 2010 Connectivity and glass transition in disordered oxide systems. *Journal of Non-Crystalline Solids* **356**: 2534-2540.
- PARRA, J., 2010 Mass Rearing of Egg Parasitoids for Biological Control Programs. In: *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*, ed. F. L. Consoli, J. R. P. Parra and R. A. Zucchi. Springer Netherlands: 267-292.
- PETRAKIS, P., 2011 First record of *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Greece. *Entomologia Hellenica* **20**: 83-93.
- POSTALI PARRA, J. R., 2010 Mass Rearing of Egg Parasitoids for Biological Control Programs. In: *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*, ed. F. L. Consoli, J. R. P. Parra and R. A. Zucchi. Springer Netherlands: 267-292.
- RAJAMOHAN, A., and R. A. LEOPOLD, 2007 Cryopreservation of Mexican fruit flies by vitrification: Stage selection and avoidance of thermal stress. *Cryobiology* **54**: 44-54.
- RAJAMOHAN, A., R. A. LEOPOLD, W. B. WANG, M. HARRIS, S. D. MCCOMBS *et al.*, 2003 Cryopreservation of Mediterranean Fruit fly Embryos. *Cryoletters* **24**: 125-132.
- RALL W.F., FAHY G.M., 1985a – Vitrification, a new approach to embryo cryopreservation. – *Theriogenology*, 23: 220.
- RALL W.F., FAHY G.M., 1985b – Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. – *Nature*, 313:573-575.
- RING, R. A., 1981 The physiology and biochemistry of cold tolerance in arctic insects. *Journal of Thermal Biology* **6**: 219-229.

- RING, R. A., 1983 Cold tolerance in Canadian arctic insects, pp. 17-29 in *Plant, animal, and microbial adaptations to terrestrial environment*, edited by N. S. MARGARIS, M. ARIANOUTSOU-FARAGGITAKI and R. REITER. Plenum Press. , New York.
- RING, R. A., and D. TESAR, 1981 Adaptations to cold in Canadian arctic insects. *Cryobiology* **18**: 199-211.
- ROMEIS, J., T. SHANOWER and K. MADHURI, 2000 Biology and field performance of *Gryon clavigrallae* (Hymenoptera: Scelionidae), an egg parasitoid of *Clavigralla* spp.(Hemiptera: Coreidae) in India. Bulletin of entomological research **90**: 253-263.
- RONGLIN, Y., A. HAGEN and S. W. OMHOLT, 1997 Cryopreservation of Totipotent Nuclei from Honeybee (*Apis mellifera*) Embryos by Rapid Freezing. *Cryobiology* **35**: 41-45.
- ROVERSI, P. F., E. COSI e T. IRDANI, 2008 - Chill sensitivity and cryopreservation of eggs of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). - *Cryobiology* **56**: 1-7.
- ROVERSI, P. F., W. B. STRONG, V. CALECA, M. MALTESE, G. SABBATINI PEVERIERI, MARIANELLI L., MARZIALI L. e STRANGI A., 2011 - Introduction into Italy of *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead), an egg parasitoid of the alien invasive bug *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. - *EPPO Bulletin* **41**: 72-75.
- SABBATINI PEVERIERI, G., P. FURLAN, S. SIMONI, W. B. STRONG and P. F. ROVERSI, 2012 Laboratory evaluation of *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead) (Hymenoptera, Platygasteridae) as a biological control agent of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera, Coreidae). *Biological Control* **61**: 104-111.
- SABBATINI PEVERIERI, G., P. FURLAN, D. BENASSAI, S. CARADONNA, W. B. STRONG, ROVERSI P.F., 2013 Host egg age of *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera, Coreidae) and parasitism by *Gryon pennsylvanicum* (Hymenoptera, Platygasteridae). *Journal of Economic Entomology*, 106(2).
- SALT R.W., 1960 – Principles of insect cold-hardiness. – *Annual Review of Entomology*, 6: 55-74.
- SARAGUSTY J., ARAV A., 2011 – Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. – *Reproduction*, 141: 1-19.

- SØMME, L., 1982 Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **73**: 519-543.
- SMITH S.M., HUBBES M. e CARROW J.R., 1987 – Ground release of *Trichogramma minutum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) against the spruce bud worm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). – *Canadian Entomologist*, 119: 251-253.
- SMITH S.M., 1994 – Method and timing releases of *Trichogramma* to control lepidopterous pests. In: *Biological control with egg parasitoids*. eds. E.A. Wajnberg e S.A. Hassan, CAB International : 113-144.
- SOKAL R. R., ROHLF F. J., 1997. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3rd edition. W. H. Freeman and Co.: New York. 850 pp.
- SPSS Inc., 2004: SPSS ver. 13.0 - Advanced Model. SPSS Inc., Chicago, Illinois
- STEPONKUS P.L., MYERS S.P., LYNCH D.V., GARDNER L., BRONSHTEYN V., LEIBO S.P., RALL W.F., PITT R.E., LIN T.T., MACINTYRE R.J., 1990 – Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. – *Nature*, 345: 170-172.
- STEPONKUS, P. L., 1997 *Advances in low-temperature biology*. Elsevier Science Limited.
- STEPONKUS, P. L., and S. CALDWELL, 1993 An optimized procedure for the cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Cryo-letters* **14**: 377-382.
- STRONG-GUNDERSON J.M., LEOPOLD R.A., 1989 – Cryobiology of *Musca domestica* : supercooling capacity and low-temperature tolerance. – *Environmental Entomology*, 18: 756-762.
- SUGIYAMA, M., S. TANIGUCHI, A. IKOMA, T. ARIMA and N. ZHAO, 2012 Fluctuating hydrodynamics based on extended thermodynamics. *Note di Matematica* **32**: 227-238.
- SUTTON, R. L., 1992 Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars and polysaccharides. *Cryobiology* **29**: 585-598.
- TAYLOR, M. J., 1987 Physico-chemical principles in low temperature biology in *The effects of low temperatures on biological systems*, edited by B. W. W. GROUT and G. MORRIS. Edward Arnold, London.

- THOMPSON S.N., 1986 – Nutrition and in Vitro Culture of Insect Parasitoids. – Annual Review of Entomology, 31: 197-219.
- VAN DRIESCHE R.G. *et al.*, 2010 – Classical biological control for the protection of natural ecosystems. – Biological Control, 54 suppl. 1: 2-33.
- VAN LENTEREN, J. C., 2003 Need for quality control of massproduced biological control agents, pp. 1-18 in *Quality control and production of Biological control agent. CAB International, Wallingford, UK*, edited by J. C. VAN LENTEREN. CABI Publishing, Biddles Ltd, Guildford and King's Lynn, UK.
- VAN LENTEREN J.C., 2012 – The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. – BioControl, 57(1): 1-20.
- VAN LENTEREN J.C. e Bueno H.P., 2003 – Augmentative biological control of arthropods in latin America. – BioControl, 48: 123-139.
- VAN LENTEREN, J. C., and M. G. TOMMASINI, 2003 - Mass Production, Storage, Shipment and Quality Control of Natural Enemies. In: *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops* eds. R. Albajes, M. Lodovica Gullino, J. C. Lenteren and Y. Elad. Springer Netherlands: 276-294.
- VANDERZANT E.S., 1974 – Development, significance and application pf artificial diets for insects. - Annual Review of Entomology, 19: 139-160.
- VOGT, E. A., and J. R. NECHOLS, 1993 The Influence of Host Deprivation and Host Source on the Reproductive Biology and Longevity of the Squash Bug Egg Parasitoid *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead) (Hymenoptera: Scelionidae). Biological Control **3**: 148-154.
- VV.AA., 1991 Abstracts of papers presented at the Twenty-Eighth Annual Meeting of the Society for Cryobiology. Cryobiology **28**: 511-598.
- WANG, W., R. LEOPOLD, A. HANDLER and T. FREEMAN, 2000a Cryopreservation of Caribbean Fruit Fly (*Anastrepha suspensa*) embryos. In: Abstracts 2000 Annual Meeting of Entomological Society Of America.
- WANG, W. B., R. A. LEOPOLD, D. R. NELSON and T. P. FREEMAN, 2000b Cryopreservation of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) Embryos. Cryobiology **41**: 153-166.
- WHITTINGHAM D.G., LEIBO S.P., MAZUR P., 1972 – Survival of mouse embryos frozen to – 196 degrees and – 269 degrees C. – Science, 178: 411-414.

- WILLADSEN S.M., 1977 – Factors affecting the survival of sheep embryos during-freezing and thawing. Ciba Foundation Symposium, 52: 175-201.
- YAMASHITA O., HASEGAWA K., 1985 – In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, eds. G.A. kerkut e L.I. Gilbert, Pergamon Press, Oxford: 407-434.
- ZACHARIASSEN, K. E., 1985 Physiology of cold tolerance in insects. Physiological Reviews **65**: 799-832.
- ZARZYCKI, J., 1991 *Glasses and the vitreous state*. Cambridge University Press.
- ZEILMAKER G.H., ALBERDA A.T., VAN GENT I., RIJKMANS C.M., DROGENDYIK A.C., 1984 – Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. – Fertility and Sterility, 42: 293-296.